

## چکیده

اسکروفولاریا استریاتا گیاه دارویی است که در شمال شرق ایران می روید و از مدت ها قبل به عنوان یک داروی گیاهی سنتی برای درمان بیماری های التهابی مختلف استفاده می شود. این مطالعه جهت بررسی اثرات ضد توموری عصاره ی اسکروفولاریا استریاتا بر رده سلولی لوکمیای انسانی، K562 طراحی شده است. اثرات مهاري عصاره بر سلول های K562 به وسیله ی آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. علاوه بر آن ، القای آپوپتوز سلولی نیز به وسیله ی رنگ آمیزی ANNEXIN V-FITC/ PI با فلوسیتومتری بررسی شد.

نتایج نشان داد که درمان با عصاره این گیاه به طور قابل توجه و معنی داری ( $P < 0.05$ ) اثر سیتوتوکسیک روی رده های سلولی داشته است. و این اثر وابسته به زمان و غلظت دارو بود. علاوه بر آن ، نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که عصاره ی گیاه اسکروفولاریا استریاتا موجب القای آپوپتوز در سلول های توموری می شود.

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن است که عصاره ی اسکروفولاریا استریاتا می تواند باعث مهار رشد سلول های لوکمیای انسانی از طریق القای آپوپتوز شود. با این وجود مطالعات بیشتری برای بررسی مکانیسم های دیگر دخیل در این فرایند و اجزا تشکیل دهنده ی این گیاه دارویی که مسئول این اثرات می باشند مورد نیاز است.

**کلید واژه ها:** اسکروفولاریا استریاتا ، آپوپتوز ، لوکمیای انسانی K562

## فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
فصل اول : مقدمه و بیان مسأله .....	۱
مقدمه	
۱-۱- تعریف سرطان .....	۲
۲-۱- آپوپتوز .....	۲
۳-۱- لوسمی .....	۳
۴-۱- لوسمی میلویدی مزمن .....	۴
۵-۱- طبقه بندی انواع لوسمی .....	۶
۶-۱- علائم بالینی .....	۶
۷-۱- اپیدمیولوژی .....	۸
۸-۱- تشخیص .....	۸
۹-۱- پیش آگهی .....	۹
۱۰-۱- درمان .....	۹

۱۱-۱- اهمیت گیاهان دارویی ..... ۹

۱۲-۱- اسکروفولاریاسه (گل میمونی) ..... ۱۰

۱۳-۱- اسکروفولاریا استریاتا ..... ۱۲

## بیان مساله

۱۴-۱- ضرورت انجام مطالعه ..... ۱۴

۱۵-۱- اهداف و فرضیات ..... ۱۴

۱۶-۱- نوع مطالعه و ملاحظات اخلاقی ..... ۱۵

۱۷-۱- جدول متغیر ها ..... ۱۵

فصل دوم: بررسی متون و مروری بر مقالات ..... ۱۶

۱-۲- اسکروفولاریا استریاتا ..... ۱۷

۲-۲- خواص فارماکولوژیکی ..... ۱۹

فصل سوم: مواد و روش کار ..... ۲۴

۱-۳- مواد و لوازم و دستگاه های مصرفی برای MTT ..... ۲۵

۲-۳- مواد و لوازم و دستگاه های مصرفی برای فلوسیتومتری ..... ۲۷

۳-۳- محلول ها ..... ۲۷

- ۳-۳-۱- بافر فسفات سالین ..... ۲۷
- ۳-۳-۲- تریپان بلو ..... ۲۷
- ۳-۳-۳- ال- گلوتامین ۲ میلی مولار ..... ۲۸
- ۳-۴- جمع آوری گیاه ..... ۲۸
- ۳-۵- عصاره گیری از گیاه ..... ۲۸
- ۳-۵-۱- نگهداری و خشک کردن گیاه دارویی ..... ۲۸
- ۳-۵-۲- آسیاب کردن ..... ۲۹
- ۳-۵-۳- عصاره گیری ..... ۲۹
- ۳-۶- تهیه غلظت های مختلف از عصاره ..... ۳۰
- ۳-۷- بررسی زنده ماندن سلول ها به وسیله تریپان بلو ..... ۳۰
- ۳-۸- معرفی رده سلول های مورد استفاده در این تحقیق ..... ۳۱
- ۳-۸-۱- K562 ..... ۳۱
- ۳-۸-۲- PBMC ..... ۳۲
- ۳-۹- کشت سلول و انواع آن ..... ۳۱
- ۳-۹-۱- کشت سوسپانسیونی ..... ۳۲

۳-۹-۲- محیط کشت ..... ۳۲

۳-۹-۳- کشت رده های سلولی ..... ۳۲

۳-۹-۴- تعویض محیط کشت ..... ۳۳

۳-۹-۵- شمارش سلولی ..... ۳۳

۳-۱۰- تست مقدماتی برای تعیین تعداد سلول مناسب تست MTT ..... ۳۴

۳-۱۱- تست MTT ..... ۳۴

۳-۱۲- فلوسیتومتری ..... ۳۷

۳-۱۳- نرم افزار های رایانه ای و تجزیه تحلیل های آماری ..... ۳۹

فصل چهارم : یافته ها ..... ۴۰

۴-۱- نتایج ..... ۴۱

فصل پنجم : بحث و نتیجه گیری ..... ۴۸

۵-۱- بحث و نتیجه گیری ..... ۴۹

۵-۲- پیشنهادات ..... ۵۵

منابع ..... ۵۶

چکیده انگلیسی ..... ۶۵

## فصل اول:

# مقدمه و بیان مسأله

## مقدمه

### ۱-۱- تعریف سرطان

سرطان عامل مرگ و میر انسان ها در بیشتر نقاط دنیاست و در هر سنی بروز می کند. تقریباً علت پنجاه درصد از مرگ های دوره میان سالی سرطان است (۱). سرطان از زمانی شروع می شود که DNA سلولها دچار آسیب یا جهش بشود. سلول های طبیعی بدن در اکثر موارد این آسیب ها را ترمیم می کنند ولی در سلولهای سرطانی عمل ترمیم انجام نمی شود. سرطانها به صورت بدخیم و خوش خیم، بروز می نمایند. به طور کلی سرطان به دلیل خروج سلولها از چرخه کنترل رشد طبیعی سلول و عدم آپوپتوز (apoptosis) ایجاد می شود. در شرایط طبیعی تمام سلولها رشد می کنند و به مرحله پیری و مرگ می رسند و تمام این مراحل تحت کنترل دقیق قرار دارند. سلول های سرطانی از این قاعده پیروی نمی کنند و فنا ناپذیر بوده و رشدشان از کنترل خارج می شود (۲).

### ۱-۲- آپوپتوز

واژه ی آپوپتوز برای اولین بار در سال ۱۹۷۲ میلادی توسط محققى به نام کر (Kerr) جهت توصیف مرگ فیزیولوژیک سلولی بر اساس تغییرات مورفولوژیکی و تمایز آن از نکروز معرفی شد (۳). آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می شود و برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است. آپوپتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول های T خود واکنش گر نقش دارد (۴). هر گونه اختلال در این روند موجب بیماری می شود (۵). که می تواند ناشی از مرگ سلولی بوده و موجب ایجاد و رشد سلول های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی گردد (۶). بالعکس افزایش غیر طبیعی مرگ سلولی در بیماری هایی نظیر اختلالات نورودژنراتیو و ایدز دیده می شود (۷).

در هنگام آپوپتوز غشای سلول تقارن و نظم خود را از دست می دهد و فسفاتیدیل سرین بر روی سطح سلولها عرضه می شود که عرضه این مولکول برای ماکروفاژها به منزله سیگنالی برای پاکسازی سلول آپوپتوز شده، است و به این ترتیب سلولها با نظم خاصی به رشد خود ادامه می دهند(۸).

### ۱-۳- لوسمی (Leukemia)

سرطان های خون یا لوسمی ها حدود هشت درصد کل سرطان های جمعیت انسانی را شامل می شوند که به عنوان پنجمین سرطان شایع در جهان شناخته میشوند . سرطان های بافت های خونساز بدن ، شامل مغز استخوان و دستگاه لنفاوی ، توسط سلول های سفید خون و لنف به وجود می آیند. سلول های سفید خونی معمولاً در صورت نیاز بدن، به شکلی منظم و کنترل شده رشد نموده و تقسیم می شوند . در بیماری لوسمی در مسیر تکثیر و تقسیم سلولی اختلال ایجاد شده و رشد سلول های خونی را از کنترل خارج می نماید . در بیماری لوسمی حاد ، مغز استخوان مقدار بسیار زیادی سلول های سفید خونی نارس تولید می کند و نیز، تولید طبیعی سلول های سفید خونی متوقف می شود که منجر به از بین رفتن توانایی بدن در مقابله با بیماری ها می شود (۹و ۱۰و ۱۱).

سرطان خون علاوه بر سلول های گلبول سفید می تواند شامل دیگر سلول های خونی که توسط مغز استخوان ساخته می شوند از جمله گلبول های قرمز خون و پلاکت ها باشد . لوسمی آن طور که اکثر مردم فکر می نمایند ، فقط بیماری مختص کودکان نیست . این بیماری شامل چهار نوع اصلی و چندین نوع فرعی است که فقط برخی از این انواع بین کودکان متداول است . درمان لوسمی بسیار پیچیده است و به سن ، وضعیت سلامتی ، نوع لوسمی و میزان پراکنده شدن آن بستگی دارد (۱۲و ۱۳و ۱۴).



انواع اصلی آن ، لوسمی میلوئیدی حاد (AML)؛ متداول ترین نوع لوکمی که در بزرگسالان و کودکان بروز می کند . این نوع لوکمی همچنین به لوسمی غیرلنفوسیتی نیز معروف است ) ، لوسمی لنفوسیتی حاد ( ALL) ؛ متداول ترین نوع لوکمی میان کودکان که تقریباً هشتاد درصد لوسمی های کودکان از این نوع است) ، لوسمی میلوئیدی مزمن ( CML)؛ معمولاً در سنین بزرگسالی ایجاد می شود . این لوسمی با ناهنجاری کروموزومی فیلادلفیا همراه است که ژنی غیرطبیعی به نام ABL-BCR ایجاد مینماید) ، لوسمی لنفوسیتی مزمن ( CLL)؛ متداول ترین نوع لوسمی بزرگسالان است که فرد مبتلا ممکن است سال ها بدون هیچگونه درمانی زندگی نماید این نوع لوسمی از لحاظ جغرافیایی در نژاد یهودیان روسیه و اروپای شرقی بیشتر دیده می شود. براساس آمار جهانی این نوع لوسمی هیچ گاه در کودکان ایجاد نمی شود). و سایر اختلالات مغز استخوانی مزمن (این گروه بیماری ها نیز همانند لوکمی میلوئیدی مزمن، با تولید خیلی کم یا خیلی زیاد سلول های مغز استخوان، لوسمی مزمن ایجاد می نماید ) هستند. اختلالات مغز استخوانی مزمن که منجر به لوسمی مغز استخوانی حاد میشود عارضه دیسپلازی (تکامل غیر طبیعی بافت) مغز استخوان و اختلالات مربوط به تکثیر بافت مغز استخوان هستند (۱۵).

#### ۱-۴- لوسمی میلوئیدی مزمن (CML)

لوسمی میلوئیدی مزمن بواسطه پیشروی آهسته تر، از لوسمی میلوئیدی حاد متمایز میگردد در مقابل درمان آنها مشکل تر است. لوسمی های مزمن در کل به دو دسته میلوئید و لنفوئید تقسیم می شود.

CML یک بیماری کلونال سلول های پیش ساز چند توانه (pluripotent) است. این بیماری پانزده درصد لوسمی ها را تشکیل داده و ممکن است در هر سنی اتفاق بیفتد. تشخیص CML نسبتاً مشکل بوده و با حضور کروموزوم فیلادلفیا (ph) به تشخیص کمک می شود که این امر ناشی از جا به جایی

کروموزومی (t(9;22)(q34;q11) بین کروموزوم ۹ و ۲۲ می باشد که طی آن قسمتی از پروتوانکوژن c-ABL به ژن BCR در کروموزوم ۲۲ منتقل می شود و قسمتی از کروموزوم ۲۲ به کروموزوم ۹ منتقل می شود. کروموزوم ناهنجار ۲۲ کروموزوم فیلادلفیا نامیده می شود. در جا به جایی ph اگزون ۵ از BCR با اگزون ۳ از ABL آمیخته می شود. نتیجه ژن ترکیبی ABL-BCR کد کردن پروتئین الحاقی به اندازه 210kda می باشد. این محصول فعالیت تیروزین کینازی بیشتری نسبت به محصول طبیعی (145-ABL kda) دارد. جا به جایی کروموزوم ph در عده کمی از موارد لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) هم دیده می شود، و در برخی از این موارد نقطه شکست BCR همانند CML می باشد. در تعداد اندکی از بیماران ناهنجاری ph را نمی توان با آنالیز میکروسکوپی کاریوتیپ مشاهده نمود. ولی باز آرایي ملکولی مشابهی بوسیله روش های حساس تر قابل ردیابی است برای مثال هیبریدیزاسیون فلورسنت در جا (fluorescent insitu hybridization) یا به اختصار (FISH) یا PCR. این بیماران CML که ph- منفی BCR-ABL مثبت می باشند همانند بیماران ph مثبت رفتار می کنند. از آنجایی که کروموزوم ph ناهنجاری اکتسابی استم سل سلول های خونساز می باشد، در هر دو رده ی میلوئیدی گرانولوسیت، اریتروئید و مگاکاریوسیتی و لنفوئیدی (سلول B و T) قابل ردیابی است. افزایش قابل ملاحظه در توده سلولی میلوئیدی کل بدن مسئول بسیاری از علائم بیماری می باشد. حداقل در هفتاد درصد بیماران که به درمان با ایماتینیب (imatinib) به خوبی پاسخ نمی دهند، در نهایت به لوسمی میلوئید حاد تغییر شکل خواهند داد که با فاز تسریع یافته (accelerated) نمایان می شود (۱۶).

## ۱-۵- طبقه بندی انواع CML

CML براساس نا هنجاری کروموزومی موجود، رده های سلولی درگیر و سن به انواع مختلفی تقسیم می شود که در جدول زیر می بینیم : (۱۶)

طبقه بندی لوسمی های میلوئید مزمن CML
- لوسمی میلوئید مزمن ، ph مثبت (CML , ph+)
- لوسمی میلوئید مزمن ، ph منفی (atypical) (CML , ph-)
- لوسمی میلوئید مزمن جوانان (juvenile)
- لوسمی نوتروفیلی مزمن
- لوسمی ائوزینوفیلی مزمن
- لوسمی میلو منوسیتیک مزمن (CMML)

## ۱-۶- علایم بالینی

### علایم هشدار دهنده سرطان خون (لوسمی)

- احساس ناخوشی عمومی
- تظاهر لکه های دانه اناری زیرجلدی پوست (petechiae)
- لخته یا منعقد نشدن خون در پی ایجاد زخم یا بریدگی
- ضعف و خستگی مفرط
- عفونتهای مکرر و عود آنها

- دردهای استخوان و مفاصل
- تنگی نفس در اثر فعالیت
- تب و لرز و نشانه های شبه سرماخوردگی
- رنگ پریدگی پیشرونده
- تورم و بزرگی حجم غده های لنفادی، طحال و کبد
- احساس سیری و بی اشتها
- کم خونی
- خواب آلودگی
- خونریزی مکرر بینی
- تورم و خونریزی لثه ها
- ضعف و لاغری ممتد

از علایم رایج شروع این بیماری کاهش وزن ، بی اشتها، احساس ناخوشی عمومی تب و لرز و نشانه های شبه سرماخوردگی ، عفونتهای مکرر و عود آنها و سایر علایم غیر اختصاصی است ولی چهل درصد بیماران بدون علامت بوده و در این دسته از بیماران صرفا شمارش غیرطبیعی سلول های خون در تشخیص مؤثر است. در این بیماران میزان گلبول های سفید خون به بیش از 25000 در هر میلی متر مکعب افزایش می یابد و در اسمیر خون محیطی آن ها تمامی رده های تمایز گرانولوسیتی دیده می شود . افزایش پلاکت در ۳۰ تا ۵۰ درصد این بیماران مشاهده می شود . هنگام معاینات فیزیکی اسپلنومگالی (Splenomegaly) ناهنجاری شایع در این بیماران بوده و در نیمی از بیماران قابل مشاهده است (۱۷).

## ۱-۷- اپیدمیولوژی

بیماری CML، پانزده درصد لوسمی بزرگسالان را به خود اختصاص داده است و وقوع این بیماری سالانه 1-2 نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است. بیشترین سن درگیری بیماران ۴۵ تا ۵۵ سال است، اما این بیماری در تمام گروه های سنی حتی کودکان هم دیده می شود تنها عامل خطر شناخته شده برای این بیماری مواجهه با اشعه یونیزان می باشد (۱۸).

## ۱-۸- تشخیص

افزایش شمارش گلبول های سفید (WBC) به همراه افزایش گرانولوسیت های بالغ و نابالغ دیده می شود. پلاکت تقریباً همیشه در زمان تشخیص افزایش پیدا کرده و یک آنمی نرموکروم نروموسیتیک دیده می شود. لکوسیت آلکالن فسفاتاز سلول های CML کاهش، سطح ویتامین B<sub>12</sub> و پروتئین متصل شونده به این ویتامین افزایش می یابد. تولید هیستامین به دلیل بازوفیلیا افزایش پیدا کرده و موجب علایمی چون خارش، اسهال و گرگرفتگی می شود. تشخیص قطعی با نمونه مغز استخوان می باشد که در آن افزایش سلولاریته با افزایش نسبت رده میلوئید به اریتروئید قابل مشاهده است. درصد بلاست های مغز استخوان به طور کلی نرمال یا افزایش یافته است (۱۹). در تشخیص این بیماران از روش های سیتوژنتیک استاندارد مانند FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) ساترن بلات و وسترن بلات نیز استفاده می شود که هر یک از آن ها از مشکلات خاصی در تشخیص این بیماری برخوردار است (۲۰). سازمان بهداشت جهانی (WHO) معیارهایی را برای تشخیصی CML تعیین کرده است که در جدول زیر به این معیارها اشاره شده است.

## ۱-۹- پیش آگهی

پیش آگهی بیماران CML بسیار متغیر است. قبل از درمان با ایماتینیب انتظار می رود ۱۰٪ طی دو سال منجر به مرگ شود و بعد از آن ۲۰٪ در هر سال، میزان بقای متوسط برای این بیماران تقریباً ۴ سال می باشد. فاکتور های مختلفی برای تعیین پیش آگهی این بیماری در نظر گرفته شده که از آن جمله می توان به : بلاست های در گردش ، شمارش پلاکت ، اندازه طحال ، سن و تغییرات ژنتیکی موجود اشاره کرد (۲۱).

## ۱-۱۰- درمان

تاکنون روش های مختلفی برای درمان CML مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله می توان به شیمی درمانی، درمان با آلفا اینترفرون ، ایماتینیب و پیوند مغز استخوان اشاره کرد (۲۱و۲۲). استفاده از مهار کننده تیروزین کینازی ایماتینیب مسیلات (Imatinib mesylate) که به طور اختصاصی BCR-ABL را مهار می کند و خط اول درمانی محسوب می شود (۲۳). به هر حال استفاده از این مهار کننده ها نیز با برخی اثرات جانبی از جمله مقاومت دارویی همراه بوده است و هنوز درمانی قطعی برای CML گزارش نشده است (۲۴و۲۵). اما به هر حال تنها درمان ثابت شده برای CML که در کتاب ها آمده پیوند استم سل آلورژنیک یا SCT (Stem- cell transplantation) است. ولی به خاطر خطر آن ، تنها در بیمارانی که به ایماتینیب پاسخ نمی دهند توصیه می شود (۱۶). اما همانطور که اشاره شد هر یک از این درمان ها با مشکلاتی همراه بوده است و برای حل آن راهکارهای مختلفی پیشنهاد شده است در پیرو این مطلب ما نیز برآن شدیم تا در این تحقیق اثر ضد توموری گیاه دارویی بومی اسکروفولاریا استریاتا را بررسی نماییم.

## ۱-۱۱- اهمیت گیاهان دارویی

اگر چه در نیم قرن گذشته استفاده از داروهای شیمیایی به شدت رواج یافته است، ولی به سرعت آثار زیان بار آنها بر زندگی انسان سبب گرایش مجدد به گیاهان دارویی گردیده است و این نکته که استفاده از گیاهان دارویی همواره در طول تاریخ یکی از روش های موثر درمان بوده، به خوبی روشن است. گیاهان دارویی رستنی هایی با تاریخچه جالب توجه و ممتاز هستند . علاوه بر قدمت ، گستره نفوذ این گیاهان در تاریخ ادیان و ملت ها بسیار شایان توجه است، به طوری که در جای جای حوادث مهم تاریخی، سیاسی، اجتماعی و دینی، این گیاهان مورد توجه بوده و یا منجر به بروز حوادث مهمی شده اند . استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان با تاریخ زندگی انسان هم زمان است. انسان در تمام دوران تاریخی چاره ای جز استفاده از گیاهان نداشته است (۲۶). امروزه در کشورهای اروپایی نیز استفاده از گیاهان یک عملکرد تهاجمی در برابر داروهای سمی و مضر موجود در بازار است (۲۷) به این منظور، علم پزشکی استفاده از داروها و آنتی بیوتیک های بدست آمده از گیاهان را مانند آنتی بیوتیک های سنتی (حاصل از میکروارگانیسم ها و مشتقات سنتز شده توسط آنها) مورد توجه قرار داده است (۲۸). یکی از این گونه های گیاهی مورد استفاده، اسکروفولاریا استریاتا می باشد که از نظر فیلوژنی از جنس اسکروفولاریاسه است (۲۹).

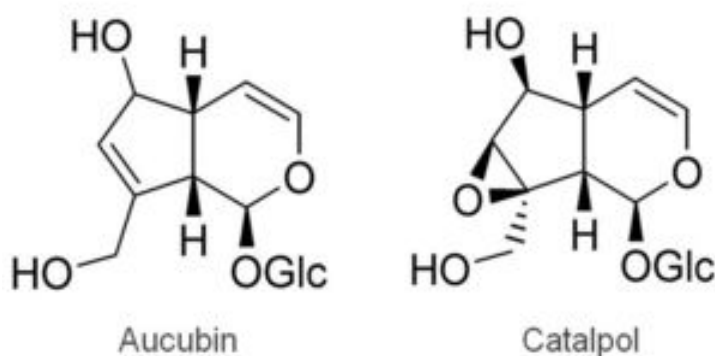
#### ۱-۱۲- اسکروفولاریاسه (گل میمونی)

اسکروفولاریاسه (گل میمون) یک خانواده بزرگ از گیاهان دانه دار است. که به طور گسترده در جنگل های زمستانی و کاج دار اروپای مرکزی ، آسیای مرکزی ، جنوب آمریکا و به خصوص در منطقه مدیترانه می رویند و حاوی ۳۰۰۰ گونه و ۲۲۰ سرده است (۳۰).

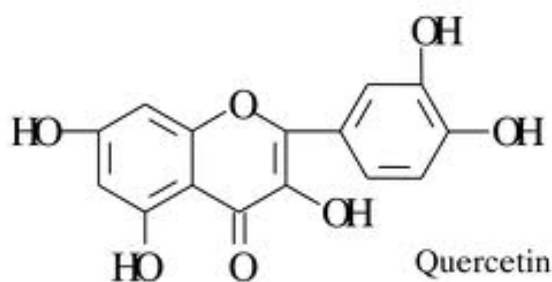
از زمان قدیم در طب سنتی برای درمان اگزما، زخم ها ، گواتر ، سرطان و فیستولا استفاده می شد. بعضی از آنها را در شیر جوشانده و از آن ضمادی به دست می آوردند و جهت کاهش درد شکمی روی

شکم می مالیدند در حالیکه از عصاره آبی آن حین حمام کردن جهت تسکین درد روماتیسمی استفاده می شده است .

گونه های اسکروفولاریاسه حاوی مقادیر زیادی از آیریدوئید گلیکوزید ها (Iridoid Glycosides) به ویژه اکوبین (Aucubin) و کاتاپل (Catapol) و کورستین (Quercetin) است (۳۱).



شکل ۱- گلیکوزید های آیریدوئید- کاتاپل و آکوبین



شکل ۲- کوئرستین (Quercetin)

آیریدوئید ها نماینده گروه بزرگی از سیکلوپنتان- C-پیران مونوترپنوئید ها (cyclopentan-[c]-pyran) هستند که جزء اصلی سازنده گیاهان گلبرگ پیوسته ، زینتی و وحشی است .



ساختار ، خواص و بیوسنتز آنها مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۲ و ۳۳ و ۳۴) . این مواد فعالیت های زیستی مختلفی از خود نشان داده اند از جمله آن می توان به خواص آنتی میکروبیال، ضد توموری ، همودینامیک ، محافظت کننده ی کبدی و ضد التهابی آن اشاره کرد (۳۵). همچنین گزارش هایی وجود دارد که حاکی از اثرات محافظت کننده ی آن روی پوست در مقابل مواد شیمیایی و سرطان ریه است که گفته می شود این اثر را از طریق Genipin که نوعی آیریدوئید است و از هیدرولیز Geniposide ( گلایکوزیدی که از میوه ی Genipa Americana و Gardenia jasmoindes ) به دست می آید ، میگذارد (۳۶ و ۳۷).

### ۱-۱۳- اسکروفولاریا استریاتا

گل سازویی یا اسکروفولاریا استریاتا با نام محلی تشنه داری گیاهی است خودرو، چند ساله و از تیره ی گل میمون که اکثراً علفی یا بوته ای و به ندرت درختی است، برگ های متناوب، متقابل یا فراهم، ساده و بدون گوشوارک دارد و دارای گل های پنج پر، زیگومورف، جام گل دارای لوب بوده و میوه معمولاً به صورت کپسول دارای دانه های متعدد می باشد. این گونه یک گیاه بومی ایران است در مناطق سردسیر و در استان ایلام و مناطقی از استان خوزستان رشد می کند (۳۹ و ۴۰).

ترکیبات شیمیایی این گیاه دقیقاً شناسایی نشده اما مردم ساکن استان ایلام سالهاست که به صورت تجربی از این گیاه به صور مختلف از قبیل جوشانده خوراکی ، بخور و ضماد در درمان بیماری های متفاوت از جمله التهاب و عفونت چشم و گوش، سوختگی های پوستی، زخم های عفونی، اپی زیاتومی، درد و اختلالات گوارشی، سرماخوردگی، هموروئید، کورک و... استفاده می کنند (۴۱).

در مطالعه ای که بوسیله عبدالرضا اردشیری لاجیمی و همکارانش صورت گرفت نشان داد که عصاره برگ و دانه این گیاه دارای خواص ضد توموری روی آستروسیتوما می باشند و نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که آپوپتوز مسئول مهار رشد سلولی است (۴۲).

در مطالعه ای دیگر اثرات مهاري اسکروفولاریا استریاتا بر روی ماتریکس متالو پروتئینازها (MMPs) مورد بررسی قرار گرفت ، همانطور که میدانیم تخریب ماتریکس خارج سلولی بوسیله MMPs باعث تهاجم، متاستاز و آنژیوژنز تومورها می شود . هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره گیاه اسکروفولاریا استریاتا بر فعالیت MMPs بود. رده سلول های توموری سارکوما (wehi-164) در این مطالعه استفاده شد ، نتایج این مطالعه نشان داد که درمان با عصاره اسکروفولاریا استریاتا با دوز  $10 \mu\text{g/ml}$  فعالیت MMPs را بطور قابل توجهی کاهش داده است (۴۳).

همچنین اثر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر روی ترمیم زخم پوستی بررسی شده است، در مطالعه ای که بهنازشوهانی و همکارانش روی خرگوش های نیوزلندی انجام دادند و با توجه به مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی صورت گرفته در این تحقیق احتمال می رود مشخص گردد که اجزاء موثر گیاه تشنه داری موجب تحریک ساخت کلاژن و انقباض سریعتر زخم، رگ زایی، اتساع عروقی و همچنین کاهش التهاب، خونریزی و ادم زخم می شود (۴۴).

از دیگر آثار و خواص این گیاه می توان به اثر ضد باکتریایی آن اشاره کرد در مطالعه ای که توسط دکتر بهرامی و دکتر ولدی به انجام رسیده است خاصیت ضد استافیلوکوکی این گیاه دارویی در محیط آزمایشگاه به اثبات رسیده است (۴۵). البته شواهدی مبنی بر خواص ضد اشیریشیا کولی و سایر میکروب ها نیز وجود دارد که در قسمت بررسی متون به تفصیل در مورد آنها صحبت خواهد شد.

## بیان مساله

### ۱-۱۴- ضرورت انجام مطالعه

بررسی اثرات ضد توموری عصاره های گیاهی جهت دستیابی به دارو های جدید ضد سرطان یکی از اقدامات رایج در مراکز تحقیقاتی در دنیا می باشد. گیاه *S.Striata* درایران رویش طبیعی دارد و همچنین اثرات ضد سرطانی آن به طور کلی به طور محدودی مورد بررسی قرار گرفته است. اثرات ضد توموری آن بر لوسمی تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است. گیاه مذکور حاوی ترکیباتی چون فلاونوئید، آیریدوئید و ... می باشد و برخی گیاهان دیگر حاوی این ترکیبات، اثرات ضد سرطانی خوبی از خود نشان داده اند. لذا در این تحقیق با انجام آزمایشات فلوسیتومتری و MTT بر رده سلولی K-562 به بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره ی اسکروفولاریا استریاتا پرداختیم.

### ۱-۱۵- اهداف و فرضیات

#### الف- هدف اصلی طرح

بررسی اثر ضد توموری گیاه دارویی اسکروفولاریا استریاتا بر رده سلول های توموری لوکمی.

#### ب- اهداف فرعی

- بررسی اثر گیاه دارویی بر Viability سلول های توموری.
- بررسی اثر گیاه دارویی بر تعداد سلول های توموری.
- بررسی القای آپوپتوز توسط این گیاه دارویی بر سلول های توموری.

### ج- هدف کاربردی

با این بررسی، در صورتی که عصاره گیاهان سبب مهار رشد در سلول های توموری شود، شناسایی اولیه شده و در تحقیقات بعدی با شناسایی مواد موثره آن، می توانند به عنوان عوامل ضد سرطانی در درمان سرطانها استفاده گردند.

### د- فرضیات

عصاره گیاه دارویی اسکروفولاریا استریاتا سبب مرگ سلول های توموری می شود.

عصاره گیاه دارویی اسکروفولاریا استریاتا سبب کاهش تعداد سلول های توموری را دارد.

عصاره گیاه دارویی اسکروفولاریا استریاتا سبب القای آپوپتوز در سلول های توموری می شود.

### ۱-۱۶- نوع مطالعه و ملاحظات اخلاقی

نوع مطالعه پایه ای (تجربی) بود و با توجه به اینکه تمام بررسی ها روی سلول های توموری انجام گرفت ، لذا مشکل اخلاق پزشکی نداشت.

### ۱-۱۷- جدول متغیرها

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته		اسمی	رتبه ای		
غلظت عصاره	*		*				مجاورت عصاره در غلظت های مختلف با تعداد یکسان از سلول ها	میکروگرم بر میلی لیتر
مرگ سلول های توموری		*		*			تخریب و مرگ سلول ها ناشی از مجاورت با عصاره	درصد
VIABILITY		*		*			ماندگاری یا زنده ماندن سلول ها	درصد

## فصل دوم:

# بررسی متون و مروری بر مقالات

## ۲-۱- اسکروفولاریا استریاتا

اسکروفولاریا استریاتا که از نظر فیلوژنی از جنس اسکروفولاریا است یک گیاه بومی ایرانی است که در مناطق سردسیر و کوهستانی مانند ایلام و زاگرس رشد می کند (۴۶). گونه های اسکروفولاریاسه حاوی مقادیر زیادی از آیریدوئید گلیکوزید ها (Iridoid Glycosides) به ویژه اکوبین (Aucubin) و کاتاپل (Catapol) است (۴۷).

آیریدوئید ها نماینده گروه بزرگی از سیکلوپنتان- c-پیران مونوترپنوئید ها (cyclopentan-[c]-pyran monoterpenoids) هستند که جزء اصلی سازنده گیاهان گلبرگ پیوسته، زینتی و وحشی است. ساختار، خواص و بیوسنتز آنها مورد مطالعه قرار گرفته است (۴۸ و ۴۹ و ۵۰). این مواد فعالیت های زیستی مختلفی از خود نشان داده اند از جمله آن می توان به خواص آنتی میکروبیال، ضد توموری، همودینامیک، محافظت کننده ی کبدی و ضد التهابی آن اشاره کرد (۵۱). همچنین گزارش هایی وجود دارد که حاکی از اثرات محافظت کننده ی آن روی پوست در مقابل مواد شیمیایی و سرطان ریه است که گفته می شود این اثر را از طریق Genipin که نوعی آیریدوئید است و از هیدرولیز Geniposide (گللیکوزیدی که از میوه ی Genipa Americana و Gardenia jasmoindes) به دست می آید، میگذارد (۵۲ و ۵۳ و ۵۴).

گل سازویی یا اسکروفولاریا استریاتا با نام محلی تشنه داری گیاهی است خودرو، چند ساله و از تیره ی گل میمون که اکثراً علفی یا بوته ای و به ندرت درختی است، برگ های متناوب، متقابل یا فراهم، ساده و بدون گوشوارک دارد و دارای گل های پنج پر، زیگومورف، جام گل دارای لوب بوده و میوه معمولا

به صورت کپسول دارای دانه های متعدد می باشد. این گونه یک گیاه بومی ایران است در مناطق سردسیر و در استان ایلام و مناطقی از استان خوزستان رشد می کند (۵۶و۵۵).



شکل ۳- گیاه دارویی اسکروفولاریا استریاتا



شکل ۴- گیاه دارویی اسکروفولاریا استریاتا

## ۲-۲- خواص فارماکولوژیکی

از اسکروفولاریا استریاتا خواص دارویی فراوانی گزارش شده است که برای درمان بسیاری از بیماری ها می تواند مورد استفاده قرار بگیرد از این جمله می توان به خواص آنتی بیوتیکی یا همان ضد میکروبی، ضد توموری ، ترمیمی ، ضد التهابی و... اشاره کرد.

در مطالعه ای ویژگی ضد توموری عصاره ی اسکروفولاریا استریاتا روی رده سلولی آستروسیتوما ی انسانی مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه در سال ۲۰۰۹ توسط عبدالرضا اردشیری لاجیمی و همکارانش در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد. در این مطالعه رده سلول های ۱۳۲۱ (آستروسیتوما ی انسانی در حضور غلظت های مختلفی از عصاره ی برگ و دانه فیلتر شده و هم در عدم حضور آن قرار گرفتند تا از این طریق اثرات ضد توموری آن در مقایسه با اتوپوزید (داروی



شیمیایی ضد سرطانی) تعیین شود. عصاره ی برگ فیلتر شده ی اسکروفولاریا اثرات ضد توموری قوی را روی سلول های ۱۳۲۱ در مقایسه با گروه کنترل (سلول هایی که در مواجهه با عصاره قرار نگرفتند) و حتی گروهی که با اتوپوزید درمان شده بودند از خود نشان داد. علیرغم عصاره ی برگ عصاره ی دانه باعث فعال شدن پرولیفراسیون سلولی شد. یافته های فلوسیتومتری نیز نشان داد که مکانیسم اصلی عصاره ی برگ در مهار پرولیفراسیون سلولی آپوپتوز می باشد. یافته های حاصل از این مطالعه نشان می دهد که برگ و دانه گیاه دارویی اسکروفولاریا استریاتا هم اثرات ضدتوموری و هم اثرات تحریک رشد دارد (۴۲).

از دیگر خواص این گیاه دارویی نوروپروتکتیو بودن آن است این اثر در مطالعه ای که توسط سید ناصر استاد و همکارانش انجام شده ، به اثبات رسیده است. در این مطالعه اثر نوروپروتکتیو عصاره ی بخش های هوایی اسکروفولاریا استریاتا در مقابل نوروتوکسیسیته ناشی از گلوتامات در سلول های کورتکس موش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج اثر نوروپروتکتیو قابل توجهی را در مقابل نوروتوکسیسیته ناشی از گلوتامات در درمان با  $10 \mu\text{g/ml}$  از عصاره ی متانولی با کمترین اثر سیتوتوکسیسیته ( سمیت سلولی ) نشان داد. (۵۷)

در مطالعه ای که در سال ۱۳۸۸ بوسیله دکتر رضا شرافتی انجام شد نشان داد که این گیاه دارای اثرات ضد میکروبی می باشد. در این مطالعه تجربی، عصاره اتانولی و آبی گیاه تهیه و اثرات ضد میکروبی آنها با استفاده از روش آگار دیفیوژن و همچنین تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC) از روش رقت لوله ای ( Macro-dilution) بر علیه باکتری E.coli O157:H7 انجام شد. آمیکاسین ( $30 \mu\text{g}$ ) به عنوان ماده ضد میکروبی مرجع استفاده شد.

عصاره اتانولی گیاه گل میمونی در هر دو روش آگار دیفیوژن و ماکرودیلوشن بر روی باکتری E.coli O157:H7 اثر مهاری داشت ولی عصاره آبی این گیاه فاقد فعالیت ضد باکتری بود (۵۸).

در مطالعه ای دیگر که توسط بهرامی و ولدی طراحی شده بود فعالیت عصاره اتانولی برگ این گیاه دارویی به تنهایی و در ترکیب با داکسی سیکلسن و افلوکسازین بر ضد استافیلوکوک اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی در این مطالعه به روش Micro-dilution مورد ارزیابی قرار گرفت. MIC و MBC در مورد گیاه دارویی به تنهایی و به همراه آنتی بیوتیک تعیین شدند. سینرژسم نیز به روش Check Board Dilution بررسی شد. نتایج نشان داد که گیاه دارویی دارای مقادیر بالاتری از MIC و MBC است و بنابراین فعالیت ضد میکروبی بیشتری دارد (۵۹).

از دیگر خواص گیاه دارویی اسکروفولاریا استریاتا خواص ترمیمی آن است که در چند مطالعه این موضوع مورد مطالعه قرار گرفته است. در مطالعه ای که عبدالرضا اردشیری لاجیمی و همکارانش انجام دادند خواص التیام بخشی این گیاه مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق بنیادی - کاربردی عصاره گیاه اسکروفولاریا استریاتا به روش عصاره گیری آبی تهیه شد. در این مطالعه از سلول های فیروبللاست پوست ختنه نوزادان انسان استفاده شد. تعداد سلول های مورد مطالعه در این آزمایش حدود ۱۰۰۰۰۰ سلول بود که در حضور ۱ و ۳ و ۵ و ۷ و ۱۰ و ۲۰ و میکروگرم در میلی لیتر از عصاره گیاه در فواصل ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوبه شدند. جهت بررسی اثر عصاره بر رشد سلولی از روش آنالیز MTT استفاده شد. عصاره گیاه اثر تحریکی بر رشد سلول های فیروبللاست انسان داشت و این اثر تابعی از زمان انکوباسیون بود. بطوریکه افزایش زمان انکوباسیون میزان آن کاهش می یافت. این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه اسکروفولاریا استریاتا در غلظت های مختلف، اثرات متفاوتی در زمینه التیام بخشی و

ضد سرطانی از خود نشان می دهد که با آزمایشات بیشتر می توان مناسب ترین دوز هر اثر را شناسایی کرد (۶۰).

در مطالعه ای دیگر توسط بهناز شوهانی و همکارانش اثر التیام بخشی عصاره هیدروالکلی گیاه تشنه داری (*Scrophularia striata*) بر روی زخم باز پوستی خرگوش مورد بررسی قرار گرفت. پس از جمع آوری و خشک نمودن قسمت های مختلف گیاه، عصاره هیدروالکلی آن به روش خیساندن تهیه و تغلیظ گردید. برای مطالعه از ۳۶ راس خرگوش نیوزلندی نر و ماده در محدوده وزنی ۲/۰۶-۱/۲۰۰ کیلوگرم استفاده شد. طبق روش Cross و همکاران زخم هایی به ابعاد ۲×۲ سانتی متر بر روی پوست پهلوی خرگوش ها ایجاد گردید و سپس به شش گروه شش تایی تقسیم گردیدند: گروه اول به عنوان شاهد بدون درمان نگهداری شد، در گروه دوم از اسرین (شاهد منفی)، گروه سوم از پماد فنی توئین ۱ درصد (شاهد مثبت) و در سه گروه دیگر از پمادهای ساخته شده از گیاه تشنه داری با غلظت های ۲ درصد، ۵ درصد و ۱۰ درصد وزنی- وزنی در پایه اسرین دوبار در روز استفاده گردید. برای بررسی روند ترمیم زخم ها هر روز کناره های زخم اندازه گیری گردید و درصد بهبودی زخم گروه های مختلف طی تمام روزهای درمان بر اساس آزمون one way ANOVA و Tukey با یکدیگر مقایسه شدند. به منظور مطالعات بافت شناسی، در روزهای هفتم و پایان درمان هر گروه نمونه هایی از ضخامت کامل زخم ها برداشته شد. در بررسی انجام شده متوسط زمان ترمیم کامل زخم در گروه های بدون درمان و درمان شده با اسرین ۲۱ روز، با پماد فنی توئین ۱ درصد، ۱۶ روز و با پمادهای ۲ درصد، ۵ درصد و ۱۰ درصد گیاه تشنه داری به ترتیب ۱۸، ۱۷ و ۱۶ روز بود. در بررسی بافت شناسی نیز علائم بهبود و تکامل بافت پوست در درمان با عصاره تشنه داری کامل تر بوده است. تمامی گروه های درمانی اختلاف معنی دار آماری ( $P < 0.05$ ) با گروه های دریافت کننده اسرین و گروه شاهد داشتند اما نتایج آماری و بافت

شناسی نشان می دهد که پماد تشنه داری ۱۰ درصد نسبت به بقیه گروه ها بهترین اثر را در ترمیم زخم پوستی خرگوش داشته است. با توجه به مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی احتمال می رود مشخص گردد که اجزاء موثر گیاه تشنه داری موجب تحریک ساخت کلاژن و انقباض سریعتر زخم، رگ زایی، اتساع عروقی و همچنین کاهش التهاب، خونریزی و ادم زخم می شود (۴۴).

در مطالعه ای اثر حفاظتی این گیاه در برابر نفروتوکسیسیته ناشی از کادمیوم و جیوه در موش مورد آزمایش قرار گرفت ، این تحقیق که بوسیله مهناز ظاهری و همکارانش صورت گرفت نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل مصرف عصاره به تنهایی ، سبب کاهش معنی داری در مقدار اوره و BUN خون گردید . درمان با عصاره سبب کاهش معنی داری در افزایش اوره، کراتینین ، BUN و اسید اوریک ناشد از کادمیوم شد. در مقایسه با گروه کنترل کلرید جیوه مقدار اوره و BUN خون را کاهش داد اما مقدار اسید اوریک و کراتینین را بالا برد . درمان با عصاره نفروتوکسیسیته ناشی از کلرید جیوه را کاهش داد (۶۱).

فصل سوم:

مواد و روش کار

### ۳-۱- مواد و لوازم و دستگاههای مصرفی برای تست MTT

آمریکا	Sigma	RPMI-1640
آلمان	Merck	اتانول
آمریکا	GIBCO	سرم جنین گاوی
آمریکا	Difco	تریپسین
ایران	انستیتو پاستور	رده سلولی K562
ایران	انستیتو پاستور	رده سلولی PBMC
آلمان	Merck	DMSO
آلمان	Merck	اسید کلریدریک
آلمان	Merck	ایزوپروپانول
آلمان	Merck	تریپان بلو
آمریکا	Sigma	MTT
ایران	لوازم و ابزار آزمایشگاهی افشار دانشگاه تربیت مدرس تهران	آب مقطر
"	"	پلیت ۹۶ حفره ای ته صاف استریل
"	"	سرنگ
"	"	فالکن
"	"	فیلتر سرنگی

لوله آمایش	"	"
گاز	"	"
کاغذ آلومینیومی	"	"
پیپت پاستور	"	"
کرایوتیوب	"	"
اپندرف	"	"
لام هموسایتومتر	"	"
تیپ سمپلر	"	"
سمپلر	"	"
میکروسکوپ نوری	Leitz	آلمان
میکروسکوپ معکوس	Nikon	ژاپن
سانتریفیوژ	Sigma	آمریکا
تانک نیتروژن	Taylor-wharton	آمریکا
فریزر $-20^{\circ}\text{C}$	Frost Master	آمریکا
فریزر $-70^{\circ}\text{C}$	Snijders	هلند
انکوباتور $\text{CO}_2$	VWR	آمریکا
اتو کلاو	ایران طب	ایران
اون	بهداد ایران	ایران
ترازوی دیجیتال	Scaltec	آلمان

### ۳-۲- مواد ، وسایل و دستگاه های مورد نیاز برای فلوسیتومتری:

دستگاه Facs Caliber BD		آمریکا
کیت Annexin-PI		"
ماده Annexin V		"
ماده PI		"

### ۳-۳- محلول ها

#### ۳-۳-۱- بافر فسفات سالین (PBS; Phosphate Buffer Saline) : ۰.۱۵ مولار

از این بافر برای شستشوی بافت ها و یا سلول ها و تهیه برخی از محلول ها استفاده گردید . برای تهیه این بافر مقادیر زیر را در ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه حل کرده و محلول به حجم لیتر رسانده می شود . سپس محلول اتوکلاو (فشار ۱۵ پوند به مدت ۲۰ دقیقه) گردیده و برای استفاده های بعدی در یخچال نگهداری می شود.

۸ گرم (Merck) NaCl

۱.۲ گرم (Merck) K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>

۰.۳۴ گرم (Merck) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

#### ۳-۳-۲- تریپان بلو ۰.۰۴ درصد (TB)

به منظور سنجش سلول های زنده (Viability) از این محلول رنگی استفاده گردید. برای تهیه این محلول ۰.۰۴ گرم پودر تریپان بلو (Merck) را در ۱۰ میلی لیتر PBS با محلول سرم فیزیولوژی حاوی سدیم آزاید (Merck) حل کرده و آن را با فیلتر صاف نمودیم.



### ۳-۳-۳- تهیه ال-گلوتامین ۲ میلی مولار:

۰.۶ گرم از ال-گلوتامین را به ۲۰ سی سی محیط کشت سلولی یا بافر فسفات سالین حل نموده و فیلتر می نماییم سپس در قسمت های ۱ میلی لیتری و هر کدام از آنها برای غنی سازی ۱۰۰ میلی لیتر کشت سلولی کافی است.

### ۳-۴- جمع آوری گیاهان مورد تحقیق

ابتدا گیاه تشنه داری از دامنه کوه های البرز، در کلاردشت استان مازندران در فصل زمستان شناسایی و جمع آوری گردید و پس از تمیز کردن گیاه اندامهای هوایی **همراه با ریشه گیاه** در سایه به مدت دو هفته خشک شده و توسط آسیاب پودر گردید و در شرایط بهینه و مناسب نگهداری شد بعد توسط دستگاههای مختلف اقدام به تهیه عصاره گیاه مذکور شد که در ادامه به به جزئیات این مطلب پرداخته می شود.

### ۳-۵- عصاره گیری از گیاهان

#### ۳-۵-۱- نگهداری و خشک کردن گیاهان دارویی

نگهداری و خشک کردن گیاهان دارویی جهت دو هدف مشخص انجام می گیرد: (۱) جلوگیری از کپک زدن، جلوگیری از عمل آنزیم ها و باکتری ها، تغییرات شیمیایی و در نتیجه ثابت نگه داشتن ترکیباب شیمیایی آن. به علاوه این امر سبب سهولت خرد شدن گیاه برای استخراج مواد متشکله آن می شود. (۲) عرضه به بازار تجارت، که از اهمیت خاصی برخوردار می باشد. چون گیاهان تازه فقط جهت استخراج روغن فرار یا اسانس مورد استفاده قرار می گیرند. اگر رنگ طبیعی گیاه با ماده دارویی مورد نظر لوازم است ثابت باقی بماند، بهتر است عمل خشک کردن در سایه انجام گیرد؛ و گر نه پوست، چوب و سرشاخه ها را در آفتاب نیز می توان خشک کرد (صمصام).

### ۳-۵-۲- آسیاب کردن

گیاهانی که مواد متشکله آنها برای مرحله استخراج مورد مطالعه قرار می گیرند، باید بصورت گرد در آیند تا سطح تماس بیشتری با حلال مربوطه داشته باشند. اندازه ذرات گیاهان پودر شده نسبت به نوع گیاه متفاوت است. از طرفی نباید زیاد نرم باشد، چون ممکن است بصورت خمیر در آمده، حلال خوبی در آن نفوذ نکند و از طرف دیگر نباید بزرگتر از ۱/۸ اینچ باشد (۶۲).

### ۳-۵-۳- عصاره گیری

استخراج مواد موثر گیاهی بوسیله حلالهای مختلف انجام می گیرد. روش عصاره گیری بستگی به نوع بافتهای گیاهی و ترکیبات موجود در گیاه دارد. مهمترین و اساسی ترین عاملی که باید در عصاره گیری مورد توجه قرار گیرد، حلال مورد استفاده است که انتخاب آن به قسمتهای مختلف یک گیاه و نیز مواد متشکله آن بستگی دارد. البته مشکل است که برای هر دسته از ترکیبات خام گیاهی حلال مخصوصی انتخاب شود، زیرا همراه این ترکیبات مواد دیگری نیز وجود دارد که روی درجه حلالیت این مواد تاثیر می گذارد. بطور کلی بهترین حلالی که می توان با آن عصاره خام یک گیاه را بدست آورد، متانول یا اتانول ۸۰٪ یا ۸۵٪ می باشد. زیرا این حلالها می توانند ۸۰٪ مواد متشکله گیاه را در خود حل نمایند. اتانول ۸۰٪ این مزیت را دارد که نشاسته موجود در گیاه بوسیله آن استخراج نمی گردد. روش خیساندن یک روش قدیمی است که بوسیله آب یا حلالهای مختلف صورت می گیرد. گیاه پودر شده را بمدت ۲ تا ۴ روز در حلال مورد نظر روی shaker قرار داده، سپس صاف می نمایند. این عمل را معمولا" در حرارت ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتیگراد و چند بار متوالی انجام می دهند. (۶۳)

### ۳-۶- تهیه غلظتهای مختلف از هر عصاره

جهت انجام مطالعات اولیه، غلظت استوک ۲۰mg/ml از عصاره ی DMSO در RPMI تهیه گردید. به این ترتیب که مقدار مورد نظر از هر عصاره بعد از وزن کردن در RPMI-1640 حل و بلافاصله بعد از حل شدن توسط فیلترهای استریلیزاسیون یکبار مصرف ۰/۲۲ $\mu$ m استریل می گردید و در ویال استریل در یخچال نگهداری می شد و همان روز جهت تهیه رقتهای مختلف: ۵۰ $\mu$ g/ml و ۱۰۰ $\mu$ g/ml و ۲۰۰ $\mu$ g/ml و ۴۰۰ $\mu$ g/ml بکار می رفت.

عصاره چون در RPMI قابل حل نبود، DMSO به عنوان حلال آن در نظر گرفته شد. عملیات انجام شده به این ترتیب بود: ابتدا ۲۰mg از عصاره وزن شده در ۱۰ $\mu$ l DMSO و ۹۹۰ $\mu$ l از محلول PBS حل گردید. (غلظت بدست آمده: ۲۰mg/ml). سایر رقتها از غلظت ۲۰mg/ml بصورت رقیق سازی های متوالی بدست آمد. با این روش رقیق سازی غلظت نهایی DMSO در هر حفره (۰/۰۱v/v) بدست آمد، که در این غلظت DMSO برای سلول ها سمی نیست. (البته به منظور اطمینان از عدم سمیت، کنترل منفی همراه با DMSO نیز در نظر گرفته شد).

### ۳-۷- بررسی زنده بودن سلولها بوسیله تریپان بلو

به منظور اطمینان از این مسأله که عصاره های گیاهی بکار برده شده روی سلول ها دارای اثرات تضعیف کننده و نه سمی بوده اند، تست viability برای سلول ها گذاشته شد.

ابتدا محلول موجود در هر حفره به منظور بالا بردن شمارش با پی پت پاستور هموژن می گردید. سپس ۱۰ $\mu$ l از محلول کشت با ۱۰ $\mu$ l محلول تریپان بلو ۱٪ (تهیه شده در نرمال سالین) مخلوط و پس از ۱ دقیقه، سلولها در زیر میکروسکوپ نوری از لحاظ نفوذ رنگ حیاتی به داخل آنها، بررسی گردیدند.

تعداد سلولهای زنده و مرده توسط لام هموسایتومتر در مربع RBC شمارش گردید و درصد زنده بودن سلولها به ترتیب زیر بدست آمد:

$$\text{Viability}\% = \frac{\text{تعداد سلول های زنده در تست}}{\text{تعداد سلول های زنده در کنترل}}$$

### ۳-۸- معرفی رده های سلولی سرطانی در این تحقیق:

۳-۸-۱- K562 رده سلولی لوسمی میلوئیدی خون است که این رده بصورت کشت سوسپانسیونی رشد و تکثیر می یابد. برای اولین بار از یک پیر زن 53 ساله مبتلا به سرطان خون مزمن جدا شد. رده سلولی با شناسنامه زیر از بانک سلولی انیستیتو پاستور تهیه شد:

NCBICode	Designation	Species	Tissue	Morphology
<a href="#">C122</a>	K562	Human	Pleural effusion	Lymphoblast-like

### ۳-۸-۲- PBMC (Peripheral Blood Monineuclear Cell) یا سلول های محیطی تک

هسته ای به عنوان رده سلولی شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

### ۳-۹- کشت سلول و انواع آن:

کشت سلول به کشتی اطلاق می شود که از سلول های حاصل از یک بافت ویژه ایجاد شده است. کشت سلولی انواع مختلفی مثل کشت تک لایه و سوسپانسیونی دارد که در این مطالعه با توجه به سلول های مورد استفاده از کشت سوسپانسیونی استفاده شد. (۶۲)

### ۳-۹-۱- کشت سوسپانسیونی:

در این نوع کشت سلول ها به صورت معلق در محیط کشت وجود داشته و تکثیر می کنند و به کف فلاسک نمی چسبند. (۶۳)

### ۳-۹-۲- محیط کشت:

برای رشد و تکثیر و بررسی سلولها در محیط خارج بدن باید در محیط کشتی با تمام شرایط که سلول در درون بدن با آنها روبرو بود فراهم گردد. محیطی که عمدتاً برای کشت سلولی بکار می رود حاوی ۵ تا ۲۰ درصد سرم جنین گوساله در RPMI1640 می باشد که به این محیط اصطلاحاً (CM) Culture Media گفته می شود که درصد سرم بصورت پسوند بعد از کلمه CM می آید. برای مثال محیط کشتی که حاوی ۱۰٪ سرم در RPMI 1640 باشد CM10 نام دارد.

RPMI 1640 محیطی حاوی اسیدهای آمینه، ویتامین ها، آنتی اکسیدان، نمک های معدنی، گلوکز، گلوکاتئون و فنول رد می باشد. در اثر کاهش PH (PH کمتر از ۶/۵ سبب توقف رشد و مرگ سلولها می گردد) و افزایش غلظت سلولی، محیط کشت سلول باید تعویض گردد که به آن اصطلاحاً Feeding نامند.

### ۳-۹-۳- کشت رده های سلولی:

رده های سلولی به منظور ماندگاری طولانی داخل کرایوتیوب در تانک نیتروژن نگهداری می شوند. بنابراین اولین اقدام جهت کشت رده های سلولی خارج ساختن آنها از تانک نیتروژن می باشد. پس از خارج ساختن هر کدام از رده های سلولی مورد نظر از تانک، سریعاً به زیر هود لامینار انتقال داده شد. با چرخاندن آرام کرایوتیوب در دست محتوی کرایوتیوب ذوب گردید. سپس محتوی کرایوتیوب توسط

پیپت پاستور به یک لوله آزمایش استریل انتقال یافت. محتوی لوله آزمایش دوبار با RPMI 1640 شستشو داده شد. بدین ترتیب که ۳ میلی لیتر RPMI 1640 به لوله اضافه و خوب با محتوای لوله مخلوط گردید. سپس لوله آزمایش به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته و دوباره عمل شستشو انجام پذیرفت. پس از دور ریختن مایع رویی به رسوب سلولی باقیمانده، ۵ میلی لیتر (CM10(RPMI+FBS 10% افزوده و بوسیله پیپت پاستور بخوبی مخلوط گردید. سپس این مخلوط به فلاسک کشت انتقال یافت و فلاسک داخل انکوباتور CO<sub>2</sub> مرطوب با دمای ۳۷<sup>0</sup>C قرار داده شد.

### ۳-۹-۴- تعویض محیط کشت

پس از چند روز نگهداری فلاسک، در اثر تکثیر سلولها محیط اسیدی شده و رنگ آن از قرمز به زرد تغییر می کند. در این حالت محیط باید تعویض می شد. بدین ترتیب که در مورد کشتهای سوسپانسیون قسمت عمده محیط کشت دور ریخته و محیط کشت جدید افزوده می شد. (۶۲)

### ۳-۹-۵- شمارش سلولی

توسط پیپت پاستور سوسپانسیون سلولی به لوله آزمایش انتقال داده می شد. پس از آن لوله آزمایش به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ می شد. سپس مایع رویی دور ریخته شده و ۱ میلی لیتر CM10 به رسوب سلولی اضافه می گردید. سپس عمل pipetting انجام می شد تا یک سوسپانسیون سلولی یکنواخت تشکیل گردد. پس از آن ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی با ۱۰ میکرولیتر تریپان بلو (0.4W/V% در سرم فیزیولوژیک) مخلوط گشته و سپس ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط را روی لام هموسایتومتر قرار داده و توسط میکروسکوپ نوری تعداد سلولهای زنده (سلولهای بی رنگ) و

سلولهای مرده (سلولهای آبی رنگ) در ۲۵ مربع مربوط به گلبولهای قرمز شمارش گشته و تعداد هر کدام در ۲۰۰۰۰ ضرب می گردید. سپس درصد زنده بودن بوسیله فرمول زیر محاسبه می شد:

$$100 \times (\text{تعداد کل سلولها} / \text{تعداد سلولهای زنده}) = \text{درصد زنده بودن}$$

برای انجام تست MTT به درصد زنده بودن بالای ۹۵٪ نیاز است. (۶۴)

### ۳-۱۰- تست مقدماتی برای تعیین تعداد سلول مناسب تست MTT

برای این منظور غلظت های رو به افزایش از هر رده سلولی در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به چاهکهای پلیت ۹۶ حفره اضافه گردید. در مورد آزمایش ما بدلیل سوسپانسیونی بودن کشت نیم ساعت بعد تست MTT انجام شد. سپس نمودار جذب در مقابل دانسیته سلول رسم شد. پس از رسم نمودار از میانه قسمت خطی این نمودار عمودی بر محور دانسیته سلول رسم گردید. نقطه برخوردی در واقع تعداد سلول مناسب برای انجام تست MTT را نشان می داد.

### ۳-۱۱- تست MTT

هدف از انجام این آزمایش بررسی اثرات احتمالی عصاره ی گیاهی بر رده های سلولی سرطانی مختلف می باشد. بررسی اثر سیتوتوکسیسیته اولین گام در بررسی آپوپتوز است. با این روش میزان مرگ سولی مورد ارزیابی قرار می گیرد. این روش قادر به تمایز آپوپتوز از نکروز نیست. در این روش از یک نمک تترازولیوم تحت عنوان:

MTT 2,5 Diphenyl tetrazolium bromide (4,5 dimethy thiazole) 3 با نام اختصاری

استفاده می شود. MTT یک ماده زرد رنگ محلول در آب است که توسط آنزیمهای دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلولهای زنده احیاء گشته و تبدیل به کریستال های بنفش رنگ فورمازان می شود که این کریستالها در آب نامحلول است. نتیجه تست MTT با اندازه گیری جذب رنگ حاصل از

واکنش (OD) و محاسبه درصد مرگ سلولی (سیتوتوکسیستی) بررسی گردید. ابتدا بوسیله رد کردن استوک ۲۰mg/ml مربوط به هر عصاره از فیلتر سرنگی عصاره ها توسط RPMI 1640 از استوک مربوطه تهیه گردید. این غلظتها شامل ۲۰۰، ۵۰، ۱۰۰، و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود.

از آنجایی که ممکن است حلالی که برای تهیه استوک مورد استفاده قرار گرفته، خود اثرات مهار رشد روی سلولها داشته باشد برای تعیین میزان مهار رشد حلال و حذف آن، غلظتهای مختلف از حلال بعنوان شاهد منفی دقیقاً مشابه روش تهیه غلظتهای مختلف از عصاره تهیه گردید. بدین ترتیب که ۱ $\mu$ l ۲۰۰ از حلال با ۱ $\mu$ l ۸۰۰ RPMI در ویال اپندرف استریل مخلوط گردید و حاصل بعنوان شاهد منفی برای غلظت ۱۰۰۰ $\mu$ l/ml عصاره در نظر گرفته شد. شاهد منفی برای سایر غلظتها مشابه روش تهیه غلظتهای مختلف از عصاره تهیه گردید.

-سوسپانسیون سلولی از هر کدام از رده های سلولی تهیه گردید. بطوریکه این سوسپانسیون حاوی تعداد سلول مناسب برای رده سلولی مورد نظر به منظور انجام تست MTT در حجم ۱ $\mu$ l ۹۰ بود. بدین ترتیب بر اساس نتایج حاصل از محاسبه تعداد سلول مناسب برای انجام تست MTT، این سوسپانسیون سلولی برای رده ی سلولی K562 طوری تهیه گردید که به ترتیب حاوی ۴۰۰۰۰، ۲۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۰۰۰ سلول در هر ۱ $\mu$ l ۹۰ بود.

-در حفرات حاشیه ای پلیت ۹۶ حفره مخصوص کشت سلول RPMI 1640 ریخته شد. این کار به منظور احتراز از پدیده اثر حاشیه ای<sup>۱</sup> صورت گرفت. در پدیده حاشیه ای بدلیل خشکی حفرات حاشیه ای، محیط کشت موجود در سایر حفرات به کناره مهاجرت کرده و سلولهای موجود در وسط حفره به دلیل فقدان محیط و خشکی خواهند مرد.

1-edge effect



1-  $9.0 \times 10^4$  از سوسپانسیون سلولی تهیه شده در درون سایر حفرات پلیت ریخته شد.

- برای هر کدام از غلظتهای عصاره ۳ حفره از پلیت در نظر گرفته و  $1.0 \times 10^4$  از هر کدام به حفرات مربوطه اضافه گردید. برای کنترل مثبت و منفی نیز این کار صورت گرفت. سه حفره نیز برای سلول به تنهایی در نظر گرفته شد.

بدین ترتیب حجم نهایی هر حفره  $1.0 \times 10^5$  شد و هر کدام از غلظتها ۱۰ برابر رقیق گردید.

در نهایت پلیت در انکوباتور مرطوب  $CO_2$  با دمای  $37^{\circ}C$  قرار داده شد.

- پس از ۴۸ ساعت، پلیت از انکوباتور خارج شد. محلول MTT با غلظت ۵mg/ml در PBS (Phosphate Buffer Saline) تهیه و به منظور استریل کردن و خارج ساختن ذرات ریز حل نشده، از فیلتر سرنگی رد شد. از این محلول به هر یک از حفرات پلیت اضافه گردید. مجدداً پلیت در انکوباتور قرار داده شد.

- پس از گذشت ۴ ساعت، پلیت از انکوباتور خارج گردید. سپس به منظور حل کردن کریستالهای فورمازان،  $1.0 \times 10^4$  محلول ایزوپروپانول اسیدی (اسید کلریدریک ۰/۰۴ مولار در ایزوپروپانول) به هر یک از حفرات اضافه گردید و با پیپت کردن به حل شدن این کریستالها کمک شد.

- پس از حل شدن کامل کریستالها پلیت در دستگاه ELISA قرار داده و جذب نوری چاهکها در طول موج ۵۷۰ نانومتر و رفرانس ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

- درصد مهار رشد برای غلظتهای مختلف هر عصاره روی هر رده سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{جذب نوری حلال} / \text{جذب نوری عصاره} - 1) = \text{درصد مهار رشد}$$

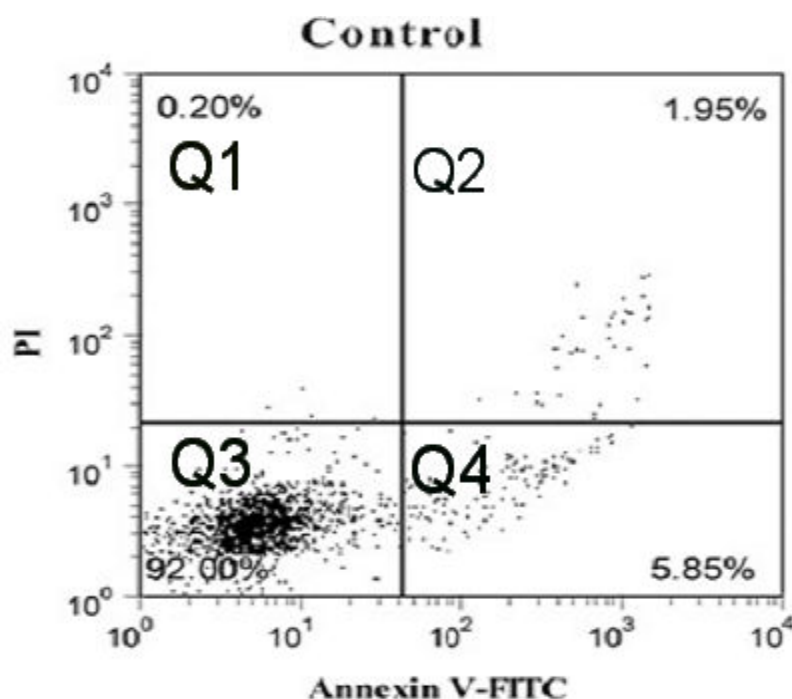
### ۳-۱۲- فلوسیتومتری

اساس این روش بر این اصل استوار است که در طی مراحل اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین که در حالت طبیعی در نیمه داخلی غشاء وجود دارد به نیمه خارجی غشاء منتقل می شود که این عمل به دلیل اختلال در آنزیم ترانس لوکاز وابسته به ATP و یا فعال شدن سیستم های آنزیمی دیگر از قبیل اسکرامبلاز (Scramblase) می باشد. قرار گرفتن فسفاتیدیل سرین در لایه ی خارجی غشاء سلولی سیگنال طبیعی است که سلول های آپوپتوتیک توسط ماکروفاژ ها و سلول های مجاور شناسایی و فاگوسیته می شوند. مشخص شده است که انکسین V که یک پروتئین ضد انعقادی و دارای وزن ملکولی ۳۵ کیلو دالتون است در حضور کلسیم با تمایل بالایی به فسفاتیدیل سرین متصل می شود و از کنژوگه ی این پروتئین با رنگ فلورسانس FITC به طور گسترده در بررسی آپوپتوز به وسیله ی فلوسیتومتری استفاده میشود. (۶۵)

فلوسیتومتری روشی است که در آن جریان یکنواخت و خطی از سلول ها در حضور ماده ی نشاندار فلورسانس، در مجرای خوانش دستگاه قرار می گیرند و توسط تابش نور لیزر، تحریک می شوند. بر اساس نوع ماده ی نشاندار فلورسانس، نشر ساطع می شود. فلوسیتومتر به طور همزمان، سه نور نشری را می تواند ثبت نماید، کمیت مورد بررسی در داده های خروجی به دنبال پردازش نرم افزاری گزارش می شود. پارامترهایی که مورد ارزیابی قرار می گیرند عبارتند از: پراش جانبی (Scattering Side)، پراش مستقیم (Forward Scattering) و نشر فلورسانس. شدت نور پراش مستقیم، متناسب با حجم سلول است. در روند آپوپتوز، کاهش در نور پراش مستقیم دیده می شود که به علت چروک شدن سلول است. بررسی آپوپتوز با استفاده از رنگ آمیزی دوگانه (Annexin-V/PI) صورت می گیرد. فلوئوروکروم مورد استفاده فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) است که در کانال سبز یا FL1 ثبت و ارزیابی می شود

و پروپیدیم آیداد (PI) که رنگ اختصاصی DNA است، در کانال قرمز (FL2) یا نارنجی (FL3) ثبت و ارزیابی می گردد. خروجی نتایج شامل منحنی پراش جانبی / پراش مستقیم جهت تعیین حدود اندازه سلولی و نحوه توزیع آن ها و هم چنین منحنی (Annexin V) / FL2 (PI) به صورت مربعات (Quadrant) چهارگانه رسم می شوند (شکل ۵) که عبارتند از:

- فوقانی چپ (Upper-left): سلول های نکروزی ( $\text{Annexin V}^- / \text{PI}^+$ )
  - تحتانی چپ (Lower-left): سلول های زنده ( $\text{Annexin V}^- / \text{PI}^-$ )
  - فوقانی راست (Upper-right): سلول های آپوپتوزی دیررس یا نکروزی ( $\text{Annexin V}^+ / \text{PI}^+$ )
  - تحتانی راست (Lower-right): سلول های آپوپتوزی اولیه ( $\text{Annexin V}^+ / \text{PI}^-$ )
- درصد هر یک از مربع ها نسبت به کل محاسبه می گردد. (۶۷ و ۶۶)



شکل ۵- خروجی نتایج حاصل از فلوسیتومتری

به منظور تعیین تعداد سلول های آپوپتوز شده در یک جمعیت سلولی درمان شده با عصاره گیاهی و قیاس آن با جمعیت سلولی در گروه شاهد منفی ، رنگ آمیزی سلول ها با دو رنگ Annexin و پروپیدوم یدید (PI) صورت گرفت. برای این کار برای غلظت های مختلف عصاره یعنی  $50 \mu\text{g/ml}$  ،  $100 \mu\text{g/ml}$  ،  $200 \mu\text{g/ml}$  و  $400 \mu\text{g/ml}$  و گروه شاهد هر کدام یک لوله در نظر گرفته شد سپس سلول هایی که با این دوز از عصاره ها به مدت ۴۸ ساعت درمان شده بودند به لوله ها اضافه شد . به همه ی لوله ها سپس ماده Annexin V طبق دستور شرکت سازنده ( $5 \mu\text{l}$  Annexin V) اضافه شده و لوله ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوبه شدند. سپس  $100 \mu\text{l}$  از محلول بایندینگ بافر Annexin V به لوله ها اضافه شد. سپس به لوله ها  $4 \mu\text{l}$  از PI که قبلاً " به نسبت ۱:۱۰ با محلول بایندینگ بافر Annexin V رقیق شده بود اضافه گردید و بار دیگر لوله ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. سپس برای شستن سلول ها  $500 \mu\text{l}$  بایندینگ بافر Annexin V اضافه شد. در نهایت سلول ها بوسیله دستگاه فلو سیتومتری و با استفاده از FL1 Channel برای شناسایی فلورسین و FL2 Channel برای شناسایی PI آنالیز شدند.

### ۳-۱۳- نرم افزارهای رایانه ای و تجزیه و تحلیل های آماری

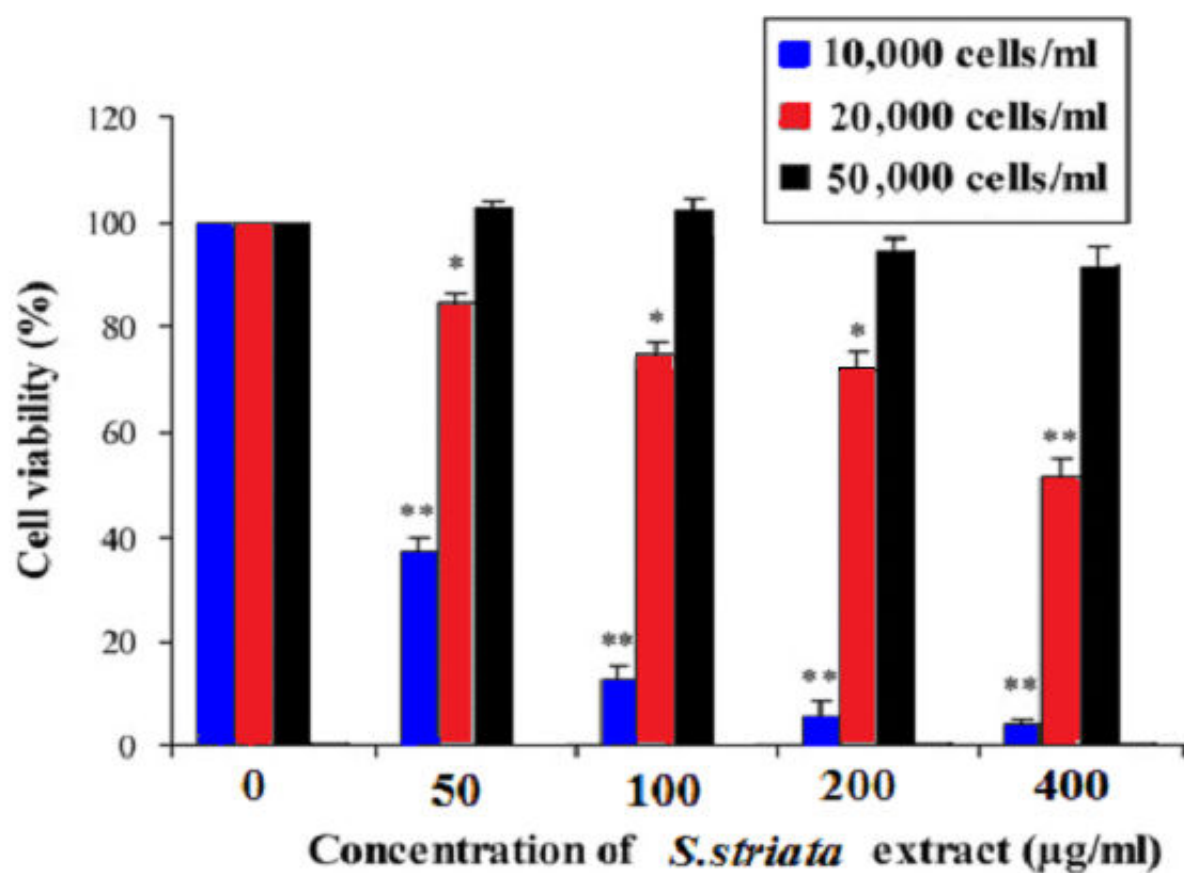
تجزیه و تحلیل های آماری به منظور انجام آزمون آماری ANOVA یک طرفه و مقایسه ی گروه های مختلف با هم در سطح  $P < 0.05$  و با استفاده از نرم افزار های SPSS صورت گرفت و نتایج در کل به شکل خطای استاندارد  $\pm$  میانگین گزارش گردید.

فصل چهارم:

یافته ها

#### ۴-۱- نتایج

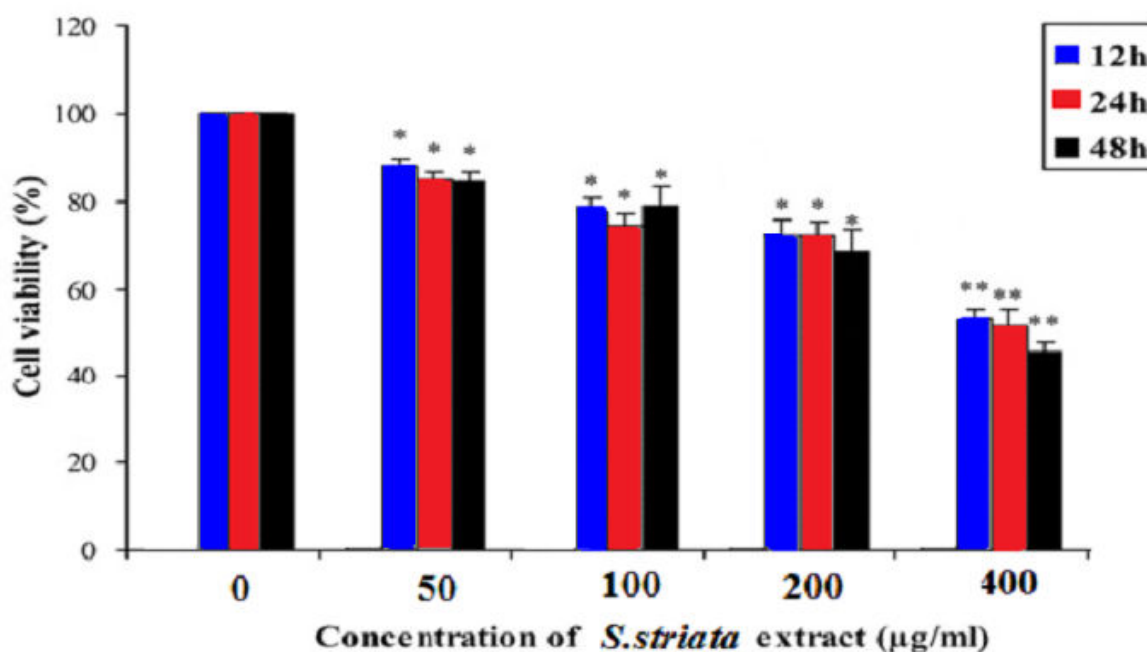
درصد بقای سلول های (cell viability) سرطانی K562 در حضور غلظت های مختلف عصاره گیاه اسکروفولاریا استریاتا در غلظت های مختلف سلولی تعیین شد (نمودار ۱). نمودار ۱- درصد بقای سلول های سرطانی را در غلظت های مختلف عصاره یعنی  $50 \mu\text{g/ml}$  ،  $100 \mu\text{g/ml}$  ،  $200 \mu\text{g/ml}$  و  $400 \mu\text{g/ml}$  در حضور غلظت های سلولی مختلف یعنی تعداد  $10000$  ،  $20000$  و  $50000$  سلول در هر میلی لیتر را نشان می دهد. همانطور که می بینیم در غلظت سلولی  $10000 \text{ cells/ml}$  و  $20000$  در هر غلظتی از دارو عصاره موجب کاهش بقای سلولی شد و در غلظت سلولی  $10000 \text{ cells/ml}$  بیشترین اثر دارویی را داریم ( $P < 0.05$  و  $P < 0.01$ ). و در غلظت سلولی  $50000 \text{ cells/ml}$  تقریباً دارو در هر غلظتی اثری نداشته است. باتوجه به این یافته در تمام مراحل این مطالعه از غلظت سلولی  $\text{cells/ml}$   $20000$  استفاده شد.



نمودار ۱- تعیین غلظت سلولی مناسب برای انجام آزمایش.

\* (P < ۰/۰۵) , \*\* (P < ۰/۰۱)

نمودار ۲، نشان دهنده ی تأثیر زمان در میزان بقای سلول های سرطانی است. این نمودار نشان می دهد که در زمان های مختلف چه تعداد سلول در غلظت های مختلف عصاره از بین رفته اند. برای این کار میزان بقای سلولی (cell viability) در غلظت های مختلف پس از ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکو باسیون اندازه گیری شد، همانطور که نمودار نشان می دهد کمترین اثر دارو پس از ۱۲ ساعت اول مشاهده می شود.

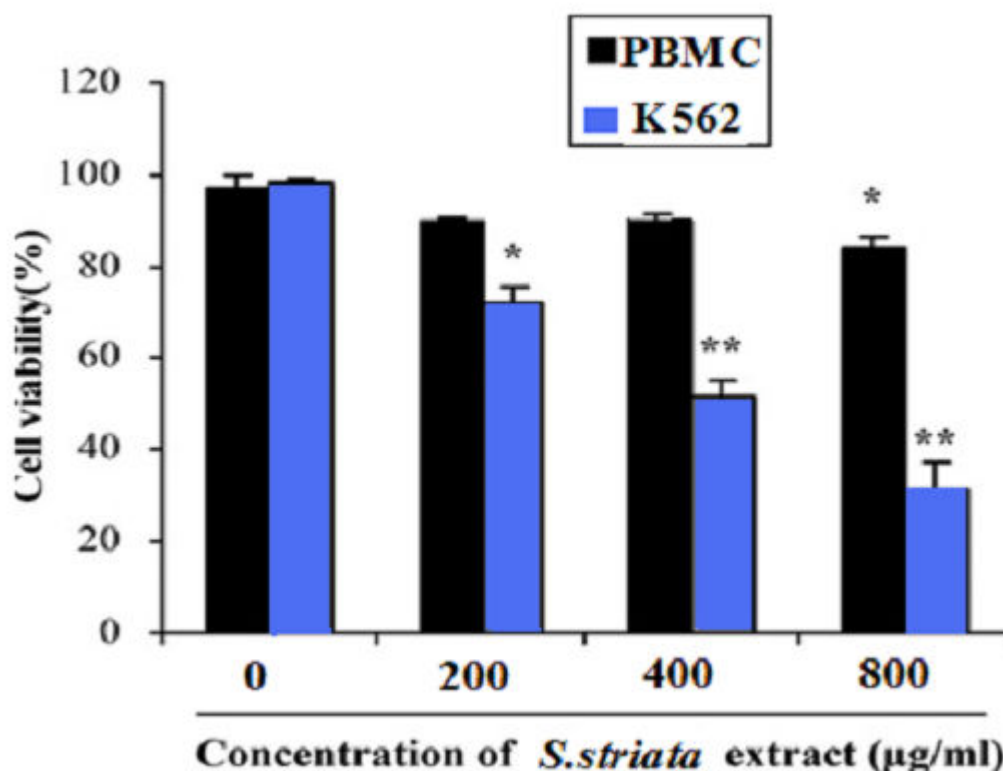


نمودار ۲- بررسی تأثیر زمان بر میزان viability سلول های k562 در حضور عصاره ی اسکروفولاریا استریاتا.

\* (P < ۰/۰۵) , \*\* (P < ۰/۰۱)



و اما برای بررسی اثر توکسیک دارو بر سلول های نرمال از رده سلول های PBMC استفاده کردیم و در نمودار ۳ میبینیم که عصاره گیاه دارویی اسکروفولاریا استریاتا تقریباً "اثرات توکسیک و کشنده ی قابل توجهی را روی سلول های طبیعی به عنوان گروه کنترل نداشته است مگر در غلظت های خیلی بالای دارو یعنی  $800 \mu\text{g/ml}$  که حدوداً "باعث از بین رفتن ۱۰ درصد سلول ها شده است.

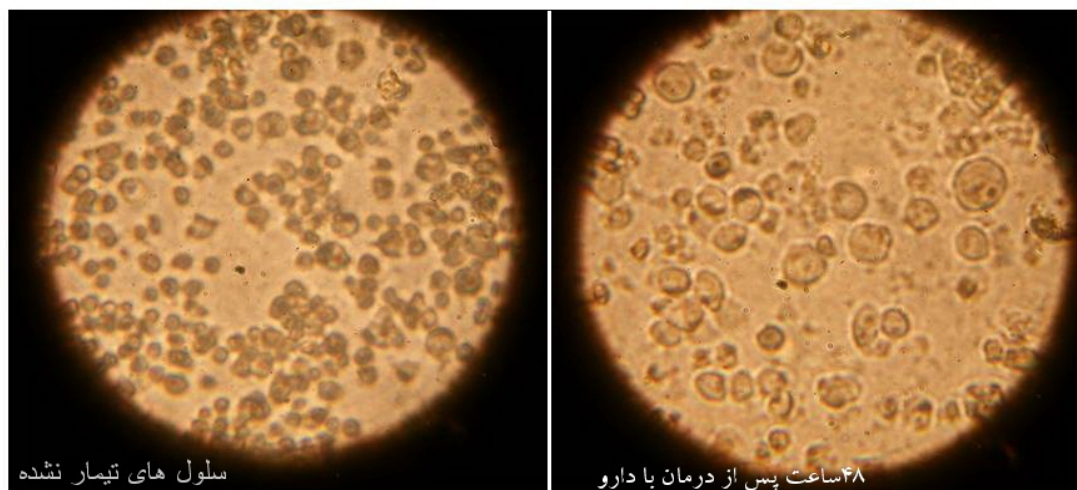


نمودار ۳- بررسی اثر عصاره اسکروفولاریا استریاتا بر سلول های نرمال.

\* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ )

نتایج حاصل از مشاهده ی سلول ها با میکروسکوپ نوری نشان داد که جمعیت قابل توجهی از سلول ها درمان شده با عصاره ی اسکروفولاریا استریاتا در مقایسه با گروه شاهد از بین رفته اند اما مکانیسم مرگ

سلولی و مقادیر عددی آن با مشاهده میکروسکوپی قابل ارزیابی نیست. تغییرات ظاهر شده در سلول های تیمار شده و کاهش جمعیت سلولی در شکل ۶ مشخص شده است.



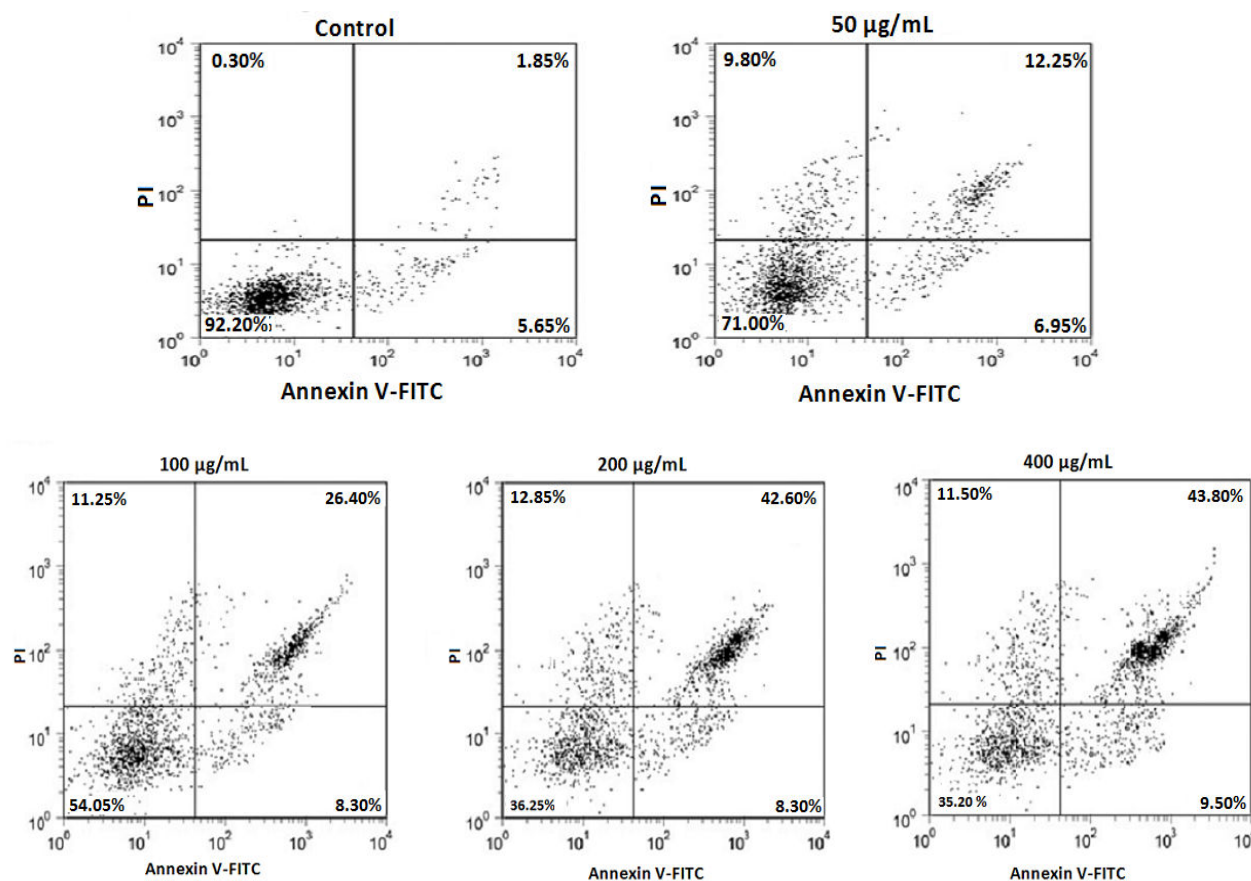
شکل ۶ - نمای میکروسکوپی رده سلولی K562 تیمار نشده و ۴۸ ساعت پس از مواجهه با عصاره ی

اندام های هوایی اسکروفولاریا استریاتا

به منظور دستیابی به مقادیر عددی القاء آپوپتوز و نکروز در نمونه های کنترل منفی (سلول های تیمار نشده)، و سلول های تیمار شده با عصاره ی گیاهی اسکروفولاریا استریاتا، آزمون فلوسیتومتری با نشانگرهای PI و Annexin-FITC انجام گردید.

در نمودارهای دو بعدی Annexin-FITC در برابر PI محاسبات مورد نظر با توجه به حدود اصلی جمعیت سلولی به روی چهار ناحیه ی اصلی  $Q_1$  تا  $Q_4$  انجام پذیرفت و درصد سلول های سالم، آپاپتوزی و نکروزی بر اساس آنچه در بخش ۳-۱۲ بدان اشاره شد مشخص گردید (شکل ۵).

سلولهای وارد شده به دستگاه فلوسیتومتر بر اساس اختلاف در میزان نشر رنگهای فلئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) و پروپیدیوم یدید (PI) که جذب سلول شده اند مورد تفکیک قرار گرفتند. در اینجا با توجه به نوع نتیجه گیری موجود در اغلب منابع، مجموع درصد سلول های قرار گرفته در نواحی  $Q_2$  (فوقانی راست) و  $Q_4$  (تحتانی راست) به عنوان درصد کل وقوع آپوپتوز (سلول های آپوپتوز شده ی پیر و جوان) در نظر گرفته شد. (۵۹).



شکل ۷- یافته های فلوسیتومتری

این گیاه به ترتیب افزایش غلظت عصاره از ۵۰ تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر باعث القای آپوپتوز به میزان ۱۹/۲٪، ۳۴/۷٪ و ۵۱٪ و ۵۳/۳٪ در سلول های توموری شده است. همانطور که گفته شد ربع فوقانی راست مربوط به سلول های آپوپتوزی دیررس و ربع تحتانی راست مربوط به سلول های آپوپتوزی اولیه می باشند

## فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

## ۵-۱- بحث و نتیجه گیری

فلات ایران در عین حال که یک واحد خاص جغرافیایی در روی کره ی زمین شمرده می شود، از اقلیم ها و محیط های گوناگون در قسمت های مختلف برخوردار است . به همین دلیل گونه های گیاهی متنوعی در آن انتشار دارند. در فلات مذکور ، پهنه اصلی انتشار جوامع گیاهی متعلق به خود کشور ایران است و در میان فلور غنی که بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی را در بر می گیرد ، تعداد بسیار زیادی از آن ها را گیاهانی تشکیل می دهند که به دلایلی دارویی نامیده می شوند. این گیاهان اکثرا از دیر باز توسط بشر شناخته شده و مورد استفاده قرار گرفته اند. با توجه به اینکه از ۵۰ سال گذشته تحقیقات فارماکودینامیکی وسیعی روی گیاهان دارویی در بیشتر کشور های جهان انجام گرفته و به ویژه در چند سال اخیر کشفیات مهمی روی ترکیبات نا شناخته گیاهان حاصل شده و بر این اساس داروهای فراوانی تهیه و به بازار عرضه گردیده است، لذا ضرورت مطالعه بر روی مواد موثره گیاهان دارویی بومی ایران و خواص زیستی آن ها بیش از پیش اهمیت یافته است . کشف گونه های جدید دارویی از بین گیاهان آورده شده از اقلیم های مختلف و پی بردن به ارزش بهداشتی این گونه های جدید و یافتن موادی از قبیل ویتامین ها ، هورمون ها و همچنین مواد ضد میکروبی و ضد توموری در میان آن ها ما را به احتمال حضور مواد موثره ارزشمند در بین گیاهان ایران بیش از پیش امیدوار ساخته است.

در حال حاضر ، اکثر جوامع علمی داروسازی و پزشکی عقیده دارند که باید کلیه تجربیات گذشته در مورد گیاهان دارویی ، دوباره با کمک روش های علمی آزمایش شوند و موارد نا شناخته و مبهم آن ها روشن گردند.

مطالعه و تحقیق در طب سنتی گیاهان دارویی به این معنی نیست که باید کلیه داروهای شیمیایی و صناعی فعلی کنار گذاشته شوند ، بلکه باید بدانیم که در طب سنتی طی قرون متمادی برای درمان یک بیماری لا

علاج یا صعب العلاج از چه نوع دارویی و چه شیوه های درمانی استفاده می شده است ، و سپس روی آن ها آزمایش و تحقیق شود . و در صورت مثبت بودن نتایج آزمایش ها ، آن داروی گیاهی را به شکل دارویی مناسب و با حداقل اثر جانبی در آوریم و در صورت لزوم جایگزین یک داروی شیمیایی با عوارض دارویی بیشتر کنیم .

استفاده از گیاهان دارویی به عنوان التیام دهنده ی بیماری ها ریشه در تمدن ۵۰۰۰ ساله چین ، هند و خاور نزدیک دارد و بی شک به عنوان هنر بشر آن روز محسوب می شود . موادی که از گیاهان به دست می آیند حدودا ۲۵ درصد از استفاده های روز پزشکی را به خود اختصاص داده اند . بعد از قرن ها که از کاربرد های تجربی گیاهان می گذرد ، جداسازی ترکیبات فعال آلکالوئیدی از جمله مرفین ، استریکنین ، کینون و غیره در اوایل قرن نوزدهم دوره ی جدیدی در تحقیقات دارویی رقم زد . اهمیت ترکیبات گیاهی با توجه به توسعه عظیم دارو های شیمیایی ساخته شده و ترکیبات ناشی از تخمیر میکروبی در جهان امروز رو به افزایش است . مصرف داروهای گیاهی در غرب اروپا تقریبا ۲ برابر شده است . اطلاعات بوم شناسی و افزایش درمان های غیر کلاسیک عوامل اصلی این تجدید نظر هستند . تاثیر ترکیبات موجود در گیاهانی همچون سیر ، سنبل الطیب ، فرفیون ، درخت معابد ( ژینگکو ) ، شیرین بیان و بسیاری دیگر از گیاهان که به وسیله ی تعدادی از محققین به اثبات رسیده است باعث گردیده تا شرکت های بزرگ داروسازی در علاقه مندی خود نسبت به ترکیبات گیاهی به عنوان دارو تجدید نظر کنند . پتانسیل گیاهان به عنوان یک منبع جدید برای دارو های جدید ، تا کنون به میزان زیادی کشف نشده است . حدودا ۲۵۰ تا ۵۰۰ هزار گونه گیاهی وجود دارد که فقط درصد کمی از دیدگاه بیولوژیکی و فارماکولوژیکی مطالعه شده اند . به طور مثال مرکز ملی سرطان آمریکا (NCI) از سال ۱۹۵۷ تا

۱۹۸۰ ، ۳۵ هزار گونه گیاهی را برای بررسی پتانسیل ضد سرطانی آن ها مطالعه کرده است و هم اکنون مطالعه حدود ۲۰ هزار گونه از گیاهان آمریکای لاتین ، آفریقا و جنوب شرقی آسیا را پیگیری می کند. روش هایی که برای ارزیابی زیستی گیاهان دارویی مورد استفاده قرار می گیرند ، به پنج گروه عمده دسته بندی می شوند:

- ۱- استفاده از موجودات کوچک از جمله میکروارگانیسم ها ، حشرات ، سخت پوستان و نرم تنان
- ۲- استفاده از ترکیبات و ساختار های سلولی از جمله آنزیم ها ، گیرنده ها و همچنین اندامک های

سلولی

- ۳- کشت سلول های انسانی و یا سلول های ما با منشا حیوانی

- ۴- اندام های جدا شده از مهره داران

- ۵- استفاده از حیوان کامل

استفاده از کشت سلولی اولین اولویت مهم برای ارزیابی اثرات ضد سرطانی می باشد . در این روش ارزیابی های سیتوتوکسیسیته صورت می پذیرد. (۶۸ و ۶۹)

تلاش های مستمر و مصرانه ای در زمینه ی مطالعه ترکیبات گیاهی ضد سرطان در دهه ۱۹۵۰ آغاز شده و همچنان در سراسر دنیا در حال پیگیری است . اولین ترکیبات مفید ضد سرطان که مورد استفاده ی پزشکی قرار گرفتند آلکالوئید آکارانتوس بودند که توسط گروه هایی از محققین آمریکایی و کانادایی به طور جداگانه مورد مطالعه و شناسایی قرار گرفتند . با جدا سازی و تعیین ساختمان این آلکالوئید ها ترکیبات وین بلاستین ، وین کریستین ، لوروسین و لوروسیدین در اواخر دهه ۱۹۵۰ و اوایل دهه ۱۹۶۰ شناسایی شدند. دو ترکیب وین کریستین و وین بلاستین به صورت داروهای تجاری در پزشکی مورد استفاده قرار می گیرند (۶۸ و ۷۰) .



با توجه به اهمیت گیاهان به عنوان منابع طبیعی حاوی مواد موثره مختلف ، بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره های گیاهی جهت دستیابی به دارو های جدید ضد سرطان یکی از اقدامات رایج در مراکز تحقیقات دنیا می باشد . در فلور غنی ایران نمونه های دارویی فراوانی وجود دارد. برخی از این گونه ها منحصر "متعلق به این منطقه جغرافیایی است که از آن جمله می توان به *Scrophularia Striata* اشاره کرد.

ما در این مطالعه فعالیت سیتوتوکسیسیته عصاره ی اسکروفولاریا استریاتا را روی رده سلولی لوکمیای انسانی K562 را مورد ارزیابی قرار دادیم. مطالعه ما نشان داد که اسکروفولاریا استریاتا بصورت وابسته به دوز و زمان موجب مهار رشد سلول های K562 می شود. به علاوه نتایج نشان داد که عصاره ی گیاه تا غلظت ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر هیچ گونه اثر سمی قابل توجهی بر سلول های نرمال (PBMC) نداشت. در مطالعاتی نشان داده شده است که بعضی اثرات ضد سرطانی گیاهان دارویی بر پایه القای آپوپتوز است (۷۱ و ۷۲ و ۷۳ و ۷۴ و ۷۵). آپوپتوز فرایندی فیزیولوژیک است که نقش مهمی در هموستاز و رشد سلول های طبیعی و سلول های سرطانی ایفا می کند (۷۶ و ۷۷) و همچنین اختلال در آپوپتوز معمولاً "به عنوان ویژگی اصلی در سرطان در نظر گرفته می شود. (۷۸) مطالعات بسیاری نیز نشان داده اند که آپوپتوز مکانیسم اصلی است که در طی آن دارو های ضد سرطانی اثرات ضد توموری خود را القا می کنند (۷۹ و ۸۰).

در بعضی مقالات فعالیت سیتوتوکسیسیته بعضی گونه های اسکروفولاریا بر رده سلول های سرطانی گزارش شده است (۸۱ و ۸۲).

در مطالعه حاضر ، برای اثبات اینکه اثر سیتوتوکسیک عصاره ی اسکروفولاریا استریاتا بر سلول های K562 در نتیجه آپوپتوز است ، درصد سلول های آپوپتوز شده توسط رنگ آمیزی Annexin V-FITC/PI اندازه گیری شد.

نتایج ما نشان داد که درصد سلول های آپوپتوز شده با افزایش غلظت عصاره زیادتر می شود . این داده ها بیانگر این موضوع است که اثرات سیتوتوکسیک عصاره ی اسکروفولاریا استریاتا می توانند از طریق القای آپوپتوز در سلول های K562 باشد . به علاوه در مطالعه ای نشان داده شده که عصاره ی گونه ای از خانواده اسکروفولاریاسه به نام *Scrophularia Floribunda* باعث القای آپوپتوز در سلول های سرطانی از طریق توقف چرخه ی سلولی شده است (۸۲) . مطالعات گذشته ی ما بیانگر اثر مهاری این گیاه بر تولید مدیاتورهای پیش التهابی تولید شده توسط ماکروفاژ ها شامل  $NO$  ،  $TNF\alpha$  ،  $IL-1\beta$  و  $PGE_2$  و همچنین اثرات مهار کننده ی آن روی تولید ماتریکس متالوپروتئیناز در سلول های سرطانی Wehi-164 بوده است (۸۳و۸۴) . به علاوه ویژگی های آنتی اکسیدان ترکیباتی چون گلیکوزید های آیریدوئید و استرهای فیل پروپانوئید که از گیاه *Scrophularia Buergeriana* جدا شده گزارش شده (۸۵و۸۶) . هرچند در مطالعات فنولیک فنول پروپانوئید و دو فلاوونوئید به نام های Quercetin و isorhamnetin 3-O-rutinoside از گیاه اسکروفولاریا استریاتا استخراج شده است (۸۷) .

Quercetin یک ماده آنتی اکسیدان شناخته شده می باشد . و ترکیبات فنولی نیز از ترکیبات آنتی اکسیدان و ضد التهابی هستند که اثرات ضد توموری آن ها در مطالعات گذشته گزارش شده است (۸۸و۸۹) . به علاوه مطالعات دیگر نشان داده اند که ترکیب isorhamnetin 3-O-rutinoside می تواند باعث القای آپوپتوز در لوکمیای انسانی (k562) شود. (۹۰و۹۱) عصاره ی این گیاه در مطالعه ی حاضر و مطالعات دیگر اثرات آنتی اکسیدان ، ضد التهابی و ضد توموری از خود نشان داده است .

اینکه آیا این ترکیبات مسئول اثرات ضد توموری اسکروفولاریا استریاتا می باشند نیاز به بررسی و تحقیقات بیشتری دارد .

در نتیجه یافته های ما در این مطالعه نشان داد که اسکروفولاریا استریاتا فعالیت سیتوتوکسیک بر رده سلول های k562 دارد . توانایی این گیاه در القای آپپتوز در سلول های سرطانی این گیاه دارویی را کاندید تحقیقات و مطالعات بیش تر در جهت یافتن ترکیبات فعال موجود در این گیاه که مسئول القای آپپتوز در سلول ها می شود کرده است.

## ۵-۲- پیشنهادات

۱. جدا سازی اجزای گیاهان و بررسی فراکشن های موثر بر آپوپتوز
۲. بررسی اثرات ضد توموری بر دیگر رده های سلولی
۳. بررسی اثر عصاره ی گیاه دارویی اسکروفولاریا استریاتا بر مدل های حیوانی و انسانی

## References

1. Henrike E.Karim-Kosa, Esther de Vriesa, Isabelle Soerjomatarama, Valery Lemmenesa, Sabine Sieslingc, Jan Willem W.Coebergha, Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s, European journal of cancer, 2008, 1345-1389.
2. Stein G.S., Pardee A.B., Cell cycle and growth control: biomolecular regulation and cancer, 2004, Hoboken, NJ, Wiley Liss.
3. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 1972; 26(4): 239-57.
4. Israel LG, Israel ED. Apoptosis. Oncologist. 1999; 4(4): 332-9
5. Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver disease – detection and therapeutic application. Med Sci Monit, 2005; 11(11): 337-45
6. Hashemi M, Krocak TJ. Apoptosis and autoimmune disease. Anti-Inflammatory and Anti-Allergy agents. Curr Med Chem, 2005; 4: 429-37.
7. Thompson CB. Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995; 267: 1456-62.
8. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM, A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells, Nature, 2004, 405, 85-90.
9. U.S. Cancer Statistics Working Group. Incidence and mortality web-based report. Atlanta: Department of Health and Human Services; 2009. Available from: <http://apps.nccd.cdc.gov/uscs/>
10. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends

in lung cancer, tobacco use and tobacco control. J Natl Canc Inst. 2008;100(23):1672-94.

11. Mossoomy Z, Mesgari M. Detection of leukemia epidemiology in Iran using GIS and statistical analyses. Pediatr Hematol Oncol. 2008;32(16):441-8.

12. Larson HJ. Introduction to probability theory and statistical inference. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons; 1992.

13. Mood AM, Graybill FA, Boes DC. Introduction to the theory of statistics. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 1974.

14. Burrough PA. Geographic information systems for natural resources assessment. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1986.

15. Elliott P, Wakefield JC, Best NG, Briggs DJ. Spatial epidemiology methods and applications. New York: Oxford University Press; 2007.

16. Essential Hematology, 5<sup>th</sup> Edition , Chapter 13. Chronic Myeloid Leukemia

17. Charles L Sawyers MD. Chronic Myeloid Leukemia: Medical Progress. N Engl J Med 1999; 340: 1330-40.

18. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of Chronic Myeloid Leukemia. N Engl J Med 1999; 341(3); 164-72.

19. Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition, Chapter 104. Acute and Chronic Myeloid Leukemia.

20. Guo JQ, Lian JY, Xian YM, Lee MS, Deisseroth AB, Stass SA, Champlin RE, Talpaz M, Wang JY, Arlinghaus RB. BCR-ABL protein expression in peripheral blood cells of chronic myelogenous leukemia patients undergoing therapy. Blood 1994; 83(12): 3629-37.

21. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M, LeukemiaNet E. Chronic myeloid leukaemia. Lancet. 2007 Jul; 370(9584): 342-50.

22. Wong S, McLaughlin J, Cheng D, Witte O. Cell context-specific effects of the BCR-ABL oncogene monitored in hematopoietic progenitors. Blood. 2003 May;101(10):4088-97.

23. Goldman J. Initial treatment for patients with CML. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009;453-60.
24. Thiesing J, Ohno-Jones S, Kolibaba K, Druker B. Efficacy of STI571, an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against bcr-abl-positive cells. Blood. 2000 Nov;96(9):3195-9.
25. Kawano T, Horiguchi-Yamada J, Iwase S, Furukawa Y, Kano Y, Yamada H. Inactivation of ERK accelerates erythroid differentiation of K562 cells induced by herbimycin A and STI571 while activation of MEK1 interferes with it. Mol Cell Biochem. 2004 Mar;258(1-2): 25-33.
26. Sesterhenn K, Distl M, Wink M. Occurrence of iridoid glycosides in in-vitro cultures and intact plants of *Scrophularia nodosa* L. Plant Cell Rep. 2007;26:365-71.
27. Holmes OW, ed. Currents and counter-currents in medical science, with other addresses and essays. Boston: Ticknor & Fields; 1861.
28. Lewis WH, Elvin-Lewis MP. Medicinal plants as sources of new therapeutics. Ann Mo Bot Gard 1995;82:16-24.
29. Stavri M, Mathew KT, Gibbons S. Antimicrobial constituents of *Scrophularia deserti*. Phytochemistry 2006;67:1530-33.
30. Richman AD, Broothaerts W and Kohn JR. Self- incompatibility rnaes from three plant families homology or convergence? Am. J. Botany. (1997) 84: 912-917.
31. Park SU, Park N, Kim YK, Suh SY, Eom SH and Lee SY. Application of plant biotechnology in the medicinal plant *Rehmannia glutinosa*. J. Med. Plants Res. (2009) 3: 1258-1263.
32. Boros CA and Stermitz FR. Iridoids, an updated review. Part 1. J. Nat. Prod. (1990) 53: 1055-1147.
33. Oh CH. Monitoring of residual pesticides in herbal drug materials of Korea and China. Bull. Environ. Toxicol. (2009) 82: 639-643.
34. El-Nagar LJ and Beal JL. Iridoids, a review. J. Nat. Prod. (1980) 43: 649-707.

35. Recio MC, Giner RM, Manez S and Rios JL. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med.* (1994) 60: 232-234.
36. Ueda S, Iwashima Y and Tokuda H. Production of antitumor promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. *J. Nat. Prod.* (1991) 54: 1677-1680.
37. Ueda S, Tokuda H, Iwashima A and Nishino H. Chemoprevention of skin and lung cancer by *Gardenia Iridoid*. *Proceeding of the International Congress on Natural Products Research*, 1994 Halifax, England (1994).
38. Weichert H, Blechschmidt I, Schroder S and Ambrosius H. The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). *Allerg. Immunol. (Leipz)* (1991) 37: 139-144.
39. Azadbakht M. [Classification of medical plants. Tehran: Teimorzadeh Pub. 2000; p: 7-276.] Persian.
40. 4-Mozafarian VA. [Khuzastan flora: Agriculture natural resources research]. Publication Center of Khuzestan Province. 1999; 353.(Persian)
41. Shohani F. [People Journalism of Ivan]. Ilam Cultural Heritageorg. 2003.p. 56-7.(Persian)
42. Abdulreza Ardeshiry Iajimia, Mostafa Rezaie-Tavirania\*, Seyed Alireza Mortazavib, Mansoureh et.al. Study Of Anti Cancer Property Of *Scrophularia Striata* Extract On Human Astrocytoma Cell Line ( 1321). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2010), 9 (4): 403-410.
43. R.hajiaghaee et. Al. inhibitory effects of aerial parts of *scrophularia striata* on matrix metalloproteinases expression. *phytotherapy research* (2007)

۴۴. بررسی اثر التیام بخشی عصاره هیدروالکلی گیاه تشنه داری بر روی زخم باز پوستی خرگوش.

بهناز شوهانی ، مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام ، زمستان ۸۸



45. A.M. Bahrami and Valadi A . Effects of *Scrophularia striata* Ethanolic Leaves Extracts on *Staphylococcus aureus*. International Journal of Pharmacology (2010) 431:434.
46. Stavri M, Mathew KT, Gibbons S. Antimicrobial constituents of *Scrophularia deserti*. Phytochemistry 2006;67:1530-33.
47. Park SU, Park N, Kim YK, Suh SY, Eom SH and Lee SY. Application of plant biotechnology in the medicinal plant *Rehmannia glutinosa*. J. Med. Plants Res. (2009) 3: 1258-1263.
48. Boros CA and Stermitz FR. Iridoids, an updated review. Part 1. J. Nat. Prod. (1990) 53: 1055-1147.
49. Oh CH. Monitoring of residual pesticides in herbal drug materials of Korea and China. Bull. Environ. Toxicol. (2009) 82: 639-643.
50. El-Nagar LJ and Beal JL. Iridoids, a review. J. Nat. Prod. (1980) 43: 649-707.
51. Recio MC, Giner RM, Manez S and Rios JL. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. Planta Med. (1994) 60: 232-234.
52. Ueda S, Iwashima Y and Tokuda H. Production of antitumor promoting iridoid glucosides in *Genipa americana* and its cell cultures. J. Nat. Prod. (1991) 54: 1677-1680.
53. Ueda S, Tokuda H, Iwashima A and Nishino H. Chemoprevention of skin and lung cancer by *Gardenia* Iridoid. Proceeding of the International Congress on Natural Products Research, 1994 Halifax, England (1994).
54. Weichert H, Blechschmidt I, Schroder S and Ambrosius H. The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). Allerg. Immunol. (Leipz) (1991) 37: 139-144.
55. Azadbakht M. [Classification of medical plants. Tehran: Teimorzadeh Pub. 2000; p: 7-276.] Persian.
56. 4-Mozafarian VA. [Khuzastan flora: Agriculture natural resources research]. Publication Center of Khuzestan Province. 1999; 353.(Persian)

57. Seyed Nasser Ostad, Neuroprotective extract prepared from the aerial parts of *Scrophularia striata* Boiss against glutamate- induced neurotoxicity in primary cultures of rat pups cortical neurons

۵۸. اثر ضد میکروبی عصاره آبی و اتانولی گیاه دارویی گل میمونی بر اشریشیا کلی در شرایط

آزمایشگاهی. فرهاد شرافتی چالشتی، رضا شرافتی چالشتی، مریم مومنی. مجله دانشگاه علوم پزشکی

شهر کرد/ ویژه نامه طب تکمیلی/ زمستان ۱۳۸۸ / 32-37

59. A.M. Bahrami and Valadi Ali. Effects of *Scrophularia striata* Ethanolic Leaves Extracts on *Staphylococcus aureus*. International Journal of Pharmacology 2010;6: 431-434

60. A.ardeshiri lajimi and M.Barzegar and M. Rezaei Tavirani. Effects of *Scrophularia striata* extract on human fibroblast cells. Medical Sciences Journal of Islamic Azad University 2009, 19(3): 168-172

61. M. Zaheri, et al . Protective Effect of aerial parts Extract of *Scrophularia Striata* on Cadmium and Mercury-Induced Nephrotoxicity in Rat. J Babol University of Medical Sciences ; 13(4) ; Jul 2011

62. Sharma.M.L, Kaul.A, singh.s, Immunostimulatory activity of Boswellilic acids from *Boswellia serrata* .phytothera Res.1996 (107-112)

63. Demirci F, Iscan G, Guven K, Kirimer N, Demirci B, Baser KH. Antimicrobial activities of *Ferulago* essential oils. Z Naturforsch [C]. 2000 Nov-Dec;55(11-12):886-9

64. Sydni.E, Lesquites.v, short course of Immunology ,3 th ed, vili company ,1998 p(120- 127)

65. Hashemi M, Karami-Tehrani F, Ghavami S, Maddika S, Los M. Adenosine and deoxyadenosine induces apoptosis in oestrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cells via the intrinsic pathway. Cell prolif, 2005; 38(5): 269-85

66. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol*, 2001; 38(2): 179-93
67. LaPensee et al. 2009; Hsu & Yen 2006; Dowejko et al. 2009; Tyagi et al. 2006
68. Hamburger M. and Hostettmann K. (1991) Bioactivity in plant: the link between phytochemistry and phytochemistry 30: 3864-3874.
69. Lacroix M., Toillon R. and Leclercq G. (2006) P53 and breast cancer , an update doctrine- Related Cancer 13: 293-325.
70. Egorin M. J. (1998) Overview of recent topics in clinical pharmacology of anticancer agents . *Cancer Chemother . Pharmacol.* 42: S22-S30
71. Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Javidnia K. Anticancer effects of various Iranian native medicinal plants on human tumor cell lines. *Neoplasma*, 53, 5, 2006.
72. Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Javidnia K. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. *J Cancer Res Clin Oncol* (2006) 132: 427–432.
73. Cuendet M, Pezzuto JM (2004) Antitumor activity of bruceantin: an old drug with new promise. *J Nat Prod* 67:269–272.
74. Li X, Ji L, Wang Z (2002) Advances in the study on the effects of Chinese herbal drugs on apoptosis. *Zhong Yao Cai* 25:135–139.
75. Shahneh FZ, , Azadmehr A, , Baradaran B. Inhibition of Growth and Induction of Apoptosis in Fibrosarcoma Cell Lines by *Echinophora platyloba* DC: In Vitro Analysis . [Adv Pharmacol Sci](#).2013 :512931
76. Adam-Klages S, Adam D, Janssen O, Kabelitz D (2005) Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity. *Immunol Res* 33:149–166.
77. Liu YL, Tang LH, Liang ZQ, You BG, Yang SL. 2010. Growth inhibitory and apoptosis inducing by effects of total flavonoids from *Lysimachia*

- clethroides Duby in human chronic myeloid leukemia K562 cells. Journal of Ethnopharmacology 131, 1–9.
78. Abbott RG, Forrest S, Pienta KJ. 2006. Simulating the hallmarks of cancer. Artificial Life 12, 617–634.
79. Wang J, Wu A, Xu YF, Liu JW, Qian XH. 2009. M2-A induces apoptosis and G2–M arrest via inhibiting PI3K/Akt pathway in HL60 cells. Cancer Letters 283, 193–202.
80. Sun B, Geng S, Huang XJ, Zhu J, Liu S, Zhang YJ, Ye J, Li YJ, Wang JZ. 2011. Coleus extract exerts cytotoxic activity by inducing G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human gastric cancer BGC-823 cells. Cancer Letters 301, 95–105.
81. Azadmehr A, Hajiaghaee R, Afshari A, Amirghofran Z, Refieian-Kopaei M, Yousofi Darani H, Shirzad H. Evaluation of in vivo immune response activity and in vitro anti-cancer effect by *Scrophularia megalantha*. J Med Plants Res 2011; 5: 2365-2368.
82. Giessrigl B, Yazici G, Teichmann M, Kopf S, Ghassemi S, Atanasov AG, Dirsch VM, Grusch M, Jäger W, Ozmen A, Krupitza G. Effects of *Scrophularia* extracts on tumor cell proliferation, death and intravasation through lymphoendothelial cell barriers. Int J Oncol. 2012 Jun;40(6):2063-74.
83. Azadmehr A, Afshari A, Baradaran B, Hajiaghaee R, Rezazadeh S, Monsef-Esfahani H. Suppression of nitric oxide production in activated murine peritoneal macrophages in vitro and ex vivo by *Scrophularia striata* ethanolic extract. J Ethnopharmacol 2009; 124: 166-169.
84. Azadmehr A, Maliji Gh, Hajiaghaee R, Shahnazi M, Afaghi A. Inhibition of pro-inflammatory cytokines by ethyl acetate extract of *Scrophularia striata*. Trop J Pharm Res 2012; 11 (6): 893-897.
85. Jeong EJ, Lee KY, Kim SH. Cognitive-enhancing and antioxidant activities of iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* in scopolamine-treated mice. Eur J Pharmacol 2008; 588: 78-84.

86. Kim SR, Koo KA, Sung SH. Iridoids from *Scrophularia buergeriana* attenuate glutamate-induced neurotoxicity in rat cortical cultures. *J Neurosci Res* 2003; 74: 948-955.
87. Monsef-Esfahani H, Hajiaghaee R, Shahverdi AR. Flavonoids, Cinnamic acid and Phenyl propanoid from aerial parts of *Scrophularia striata*. *Pharmaceutic Biol* 2010; 48: 333-336.
88. Joskova M, Franova S, Sadlonova V. [Acute bronchodilator effect of quercetin in experimental allergic asthma](#). *Bratisl Lek Listy* 2011; 112(1):9-12.
89. Jang YW, Lee JY, Kim CJ. [Anti-asthmatic activity of phenolic compounds from the roots of \*Gastrodia elata\* Bl.](#) *Int Immunopharmacol* 2010; 10(2):147-154.
90. Boubaker J, Bhourri W, Ben Sghaier M, Ghedira K, Dijoux Franca MG, Chekir-Ghedira L. Ethyl acetate extract and its major constituent, isorhamnetin 3-O-rutinoside, from *Nitraria retusa* leaves, promote apoptosis of human myelogenous erythroleukaemia cells. *Cell Prolif*. 2011 Oct; 44(5):453-61.
91. [Tundis R, Loizzo MR, Bonesi M, Menichini F, Statti GA, Menichini F.](#) In vitro cytotoxic activity of *Salsola oppositifolia* Desf. (Amaranthaceae) in a panel of tumour cell lines. [Z Naturforsch C](#). 2008 May-Jun; 63(5-6):347-54

## **Abstract**

*Scrophularia striata* Boiss (Scrophulariaceae) is a plant growing in the northeastern part of Iran and being used as a traditional herb for various inflammatory disorders. This study was designed to investigate the antitumor effects of the *Scrophularia striata* (*S. striata*) extract on K562 human leukemia cell line. The inhibitory effect of the extract on K562 cells was evaluated by MTT assay. In addition, induction of cell apoptosis was evaluated by Annexin V-FITC/PI staining. The results showed that the treatment with extract significantly showed significant cytotoxicity effect on tumor cell line. In addition, flow cytometry analysis indicated that *S. striata* extract induced apoptosis on tumor cell. The results in this study indicated that *S. striata* extract could inhibit leukemia cell growth through inducing cell apoptosis however further studies necessary.

**Keywords:** *Scrophularia striata*, apoptosis, K562 leukemia cell line